



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ  
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ  
ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY  
INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

# PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE NOSIČOVÝCH SYSTÉMŮ LÉČIV NA BÁZI MAGNETICKÝCH NANOČÁSTIC

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF DRUG CARRIER SYSTEMS ON THE BASIS OF  
MAGNETIC NANOPARTICLES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE  
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

BARBORA KAVALCOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE  
SUPERVISOR

Ing. MICHAL KALINA

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

## Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	<b>FCH-BAK0933/2014</b>	Akademický rok: <b>2014/2015</b>
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	<b>Barbora Kavalcová</b>	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)	
Vedoucí práce	<b>Ing. Michal Kalina</b>	
Konzultanti:		

### Název bakalářské práce:

Příprava a charakterizace nosičových systémů léčiv na bázi magnetických nanočástic

### Zadání bakalářské práce:

- 1) Provézt literární rešerší zabývající se metodami přípravy a stabilizace nosičových systémů léčiv na bázi magnetických Fe nanočástic
- 2) Optimalizace přípravy a stabilizace
- 3) Charakterizace připravených magnetických částic
- 4) Studium stability připravených vzorků
- 5) Závěrečné zhodnocení naměřených dat

### Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2015

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

-----  
Barbora Kavalcová  
Student(ka)

-----  
Ing. Michal Kalina  
Vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
Děkan fakulty

## **Abstrakt**

Tato práce se zabývá studiem magnetických nanočástic, optimalizací jejich přípravy a stabilizací. Koprecipitací různě koncentrovaným hydroxidem sodným byly připraveny částice o různých poměrech  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  iontů. Z takto připravených částic byly vybrány tři vzorky, u kterých byla dále pozorována jejich stabilita v Milli-Q vodě, pufru, polyvinylalkoholu, kyselině hyaluronové a chitosanu v závislosti na čase pomocí metod dynamického a elektroforetického rozptylu světla. Metodou UV-VIS spektrometrie bylo ověřeno, že se magnetické nanočástice podařilo připravit. Nanočástice obalené chitosanem a kyselinou hyaluronovou byly pak dále charakterizovány pomocí FT-IR, XRD a SEM.

## **Abstract**

This bachelor thesis deals with the study of magnetic nanoparticles, optimizing their preparation and stabilization. The nanoparticles with different ratios of  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$  ions were prepared by coprecipitation by variously concentrated sodium hydroxide. Three samples of particles were selected and were further observed. Their stability in Milli-Q water, buffer, polyvinylalcohol, hyaluronic acid and chitosan was studied in function of time using methods of dynamic and electrophoretic light scattering. By UV-VIS spectrometry it was confirmed that the magnetic nanoparticles were actually prepared. Nanoparticles coated with chitosan and hyaluronic acid were then further characterized using FT-IR, XRD and SEM

## **Klíčová slova**

magnetické nanočástice, nosičové systémy, nanotechnologie, rozptyl světla, spektroskopie, mikroskopie

## **Key words**

magnetic nanoparticles, delivery systems, nanotechnology, light scattering, spectroscopy, microscopy

KAVALCOVÁ, B. Příprava a charakterizace nosičových systémů léčiv na bázi magnetických nanočástic. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 47 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Michal Kalina.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

## **Poděkování**

Děkuji vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Michalovi Kalinovi za trpělivost, ochotu, cenné odborné rady a čas, který mi věnoval.

Dále bych chtěla poděkovat svým rodičům za finanční a morální podporu při studiu.

## Obsah

1	Úvod .....	7
2	Teoretická část.....	8
2.1	Nanotechnologie.....	8
2.1.1	Nanočástice.....	8
2.2	Magnetické nanočástice.....	8
2.2.1	Syntéza magnetických nanočástic .....	9
2.2.2	Stabilizace magnetických nanočástic .....	14
2.2.3	Charakterizace magnetických nanočástic .....	16
2.2.4	Využití magnetických nanočástic jako nosičových systémů léčiv .....	19
2.2.5	Bezpečnost a toxicita magnetických nanočástic v biomedicínských aplikacích.....	22
3	Experimentální část .....	23
3.1	Použité chemikálie.....	23
3.2	Použité přístroje.....	23
3.3	Příprava magnetických nanočástic (FeNP) .....	23
3.4	Optimalizace podmínek přípravy FeNP .....	24
3.5	Příprava magnetických nanočástic modifikovaných pomocí TMAH .....	24
3.6	Stabilizace magnetických nanočástic .....	25
3.6.1	Výběr vhodné polymerní obalové vrstvy pro FeNP .....	25
3.6.2	Studium vlivu koncentrace chitosanu a molekulové hmotnosti k. hyaluronové .....	25
3.7	Charakterizace vybraných vzorků FeNP .....	26
3.7.1	Příprava vzorků pro FT-IR analýzu.....	26
3.7.2	Příprava vzorků pro XRD analýzu .....	26
3.7.3	Příprava vzorků pro SEM analýzu .....	27
4	Diskuze a výsledky.....	28
4.1	Optimalizace přípravy magnetických nanočástic .....	28
4.1.1	Vliv poměru $\text{Fe}^{2+} : \text{Fe}^{3+}$ a koncentrace NaOH .....	28
4.1.2	Příprava magnetických nanočástic modifikovaných pomocí TMAH .....	31
4.1.3	Srovnání magnetického účinku .....	32
4.2	Stabilizace magnetických nanočástic .....	32
4.2.1	Stabilizace pomocí PVA, chitosanu, k. hyaluronové, fosfátového pufru a TMAH .....	32
4.2.2	Studium časové stálosti připravených nanočástic .....	33
4.2.3	Studium vlivu koncentrace chitosanu.....	35
4.2.4	Studium vlivu molekulové hmotnosti a koncentrace k. hyaluronové .....	35
4.3	Charakterizace vybraných vzorků FeNP .....	36
4.3.1	FT-IR analýza .....	36
4.3.2	Rentgenová prášková difraktometrie (XRD).....	38

4.3.3	Skenovací elektronová mikroskopie (SEM).....	38
5	Závěr.....	40
6	Literatura .....	41
7	Seznam použitých zkratek a symbolů .....	45
8	Přílohy .....	46

# 1 Úvod

Lidstvo je souženo různými vážnými nemocemi, proto není divu, že se neustále snaží hledat efektivnější metody jejich léčby. Nanotechnologie jsou na poli medicíny velkým fenoménem. Jejich největší uplatnění lze nalézt při vývoji nanovláken a bioimplantátů nebo také v oblasti diagnostiky a terapie. Magnetické nanočástice nacházejí největší uplatnění právě v poslední zmiňované oblasti využití nanotechnologií, jelikož nabízejí nový způsob využitelný při diagnostice a léčbě zejména nádorových onemocnění.

Při léčbě rakoviny se vkládají velké naděje do magnetických nanočástic v kombinaci s kyselinou hyaluronovou, která má schopnost se vázat na receptory nádorových buněk.

Díky svým unikátním superparamagnetickým vlastnostem, které lze dále modifikovat vhodnou povrchovou úpravou, nacházejí magnetické nanočástice potencionální uplatnění jako nosičové systémy léčiv. Užitím vnějšího magnetického pole lze takto připravené nosičové systémy zacílit na problematickou oblast, ve které je následně uvolněno léčivo.

Magnetické nanočástice se uplatňují také jako kontrastní látky při magnetické rezonanci, je tedy možné sledovat proces distribuce léčiva k postižené tkáni a zjistit tak důležité informace o přijetí léčiva a jeho šíření.

Magnetické nanočástice se využívají mimo jiné k separaci biomolekul a buněk, což má pro medicínu také velký přínos. Díky svému velkému specifickému povrchu mají schopnost na sebe vázat velké množství molekul. Magnetickou separací je možné izolovat molekuly DNA, peptidů a proteinů a v neposlední řadě i bakteriální buňky. Můžeme se tak vyhnout mnoha krokům separace jako jsou centrifugace, filtrace aj.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Nanotechnologie

Nanotechnologie se zabývá ději a strukturami, které se pohybují v měřítku 1–100 nm ( $10^{-9}$  m). Chemické a fyzikální vlastnosti částic nacházejících se v „nano oblasti“ jsou na úrovni atomů a molekul, takže jejich chování se liší od chování stejného materiálu nebo systémů, jejichž velikost částic nespádá do výše zmiňované oblasti. Nanostruktury lze rovněž kombinovat do větších celků při současném zachování jejich výhodných vlastností [1].

Nanotechnologie nabízejí možnost tvorby materiálů s novými neobvyklými kombinacemi vlastností. Nanotechnologická zařízení spotřebují méně výchozích surovin, využívají méně energie a spotřebního materiálu. S nanotechnologiemi se nám otevírají možnosti univerzálních výrobních technologií, které dost často také výrazně napomáhají vylepšit běžně využívané produkty [2].

#### 2.1.1 Nanočástice

Nanočástice představují částice velmi malých rozměrů (pod 100 nm), které mají unikátní vlastnosti (morfologické, tepelné, elektromagnetické, optické, mechanické). V případě velmi malých nanočástic o rozměrech menší než 10–20 nm dochází k radikálním změnám fyzikálních vlastností pevných látek, jako je například bod tání a dielektrická konstanta [3].

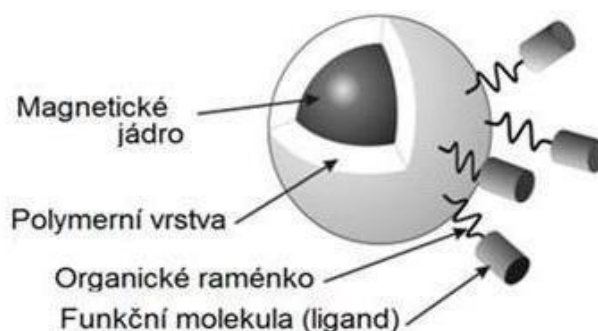
Všechny pevné nanočástice jsou tvořeny atomy nebo molekulami. S jejich zmenšováním roste jejich náchylnost k vlivu chování samotných atomů nebo molekul a vykazují tedy jiné vlastnosti než většina pevného materiálu. Se zmenšováním rozměrů pevných částic se zvětšuje jejich specifický povrch. Zvětšení specifického povrchu přímo ovlivňuje vlastnosti, jako jsou reakční rychlost, rozpustnost aj. [3].

### 2.2 Magnetické nanočástice

Magnetické nanočástice mají zajímavé vlastnosti, jako jsou superparamagnetismus, vysoká ireverzibilita pole a vysoká oblast saturace [4].

Jestliže je velikost magnetické nanočástice menší než 20 nm, stává se superparamagnetickou. Chová se tedy jako běžný materiál. Její magnetické vlastnosti se projevují navenek pouze v případě, pokud je tato částice vystavena účinkům magnetického pole [4].

Existují různé typy magnetických nanočástic. Nejčastěji jsou magnetické částice tvořeny na bázi oxidu železnato-železitého. Z dalších kovových materiálů se využívají Mn, Co, Ni, Zn, Mg a jejich oxidy [4].



Obrázek 1 Schéma magnetické nanočástice [5]

Funkční magnetické nanočástice se skládají z několika částí (Obrázek 1). Základ představuje magnetické jádro, které je obaleno ochrannou polymerní vrstvou. Funkčnost pro danou aplikaci zajišťují aktivní funkční molekuly, které jsou propojeny nejčastěji pomocí organického spojení raménka [5].



Magnetické jádro může být tvořeno různými atomy. Příkladem je kobalt nebo chrom, které jsou ovšem velmi toxické. Pro využití v medicíně se využívají materiály založené na oxidech železa, jako jsou magnetit a maghemit.  $\text{Fe}^{3+}$  ionty se totiž běžně vyskytují v lidském těle. Maghemit je nejvhodnějším materiálem, protože je nejvíce biokompatibilní [5].

Magnetické nanočástice je třeba chránit proti jejich degradaci (korozi). V případě nosičových systémů je také nutné zabránit vyplavování potenciálně toxických látek do těla při *in vivo* aplikaci. Jako ochranné materiály se používají přírodní polymery jako je například dextran, proteiny, lipidy nebo syntetické organické polymery jako například PVA nebo PEG a mnoho jiných [5].

Povrchové úpravy magnetických nanočástic rovněž zvyšují sílu interakce mezi léčivem a magnetickým jádrem. Bez povrchové úpravy je vazba mezi molekulou léčiva a povrchem nanočástice velmi slabá. Povrchová modifikace rovněž zefektivňuje mechanismus kontroly uvolňování léčiva z nosiče [5].

Magnetické nanočástice našly mimo jiné uplatnění v lékařské diagnostice a terapii. Využívají se k separaci proteinů nebo buněk, k léčbě rakoviny hypertermií, k cílené distribuci léčiv nebo jako kontrastní látky při magnetické rezonanci [4].

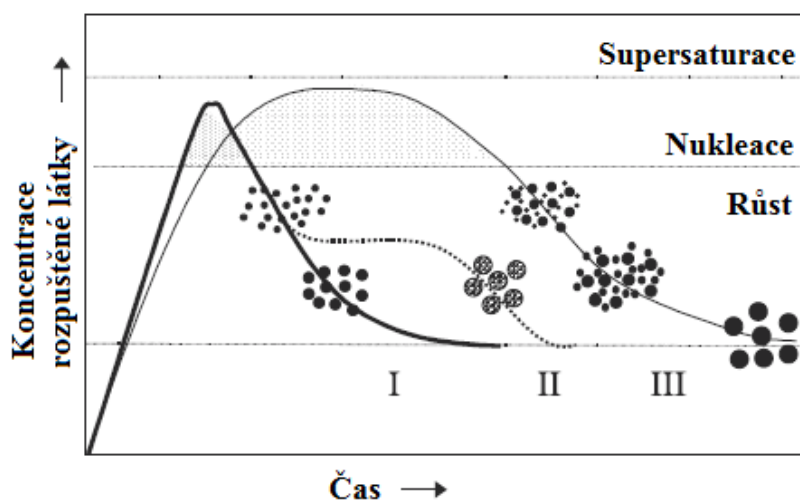
### 2.2.1 Syntéza magnetických nanočástic

Magnetické nanočástice mají koloidní povahu, proto je jejich syntéza složitý proces. Nejprve se musí definovat experimentální podmínky. Dále jsou vytvořeny monodisperzní populace magnetických zrn vhodné velikosti. Následně je potřeba vybrat reprodukovatelný proces, který může být průmyslově využit bez jakéhokoli složitého postupu čištění [6].

Důležitými kritérii při výběru metody přípravy magnetických nanočástic jsou možnost kontroly velikosti částic během syntézy (distribuce velikosti by měla být úzká) a možnost zabránit shlukování nanočástic.

#### *Precipitace*

Precipitace jsou homogenní srážecí reakce zahrnující dva procesy – nukleaci a růst jader. Tímto postupem se obvykle připravují uniformní částice. Proces je zahájen krátkou sérií nukleací, která je vyvolána kritickou koncentrací rozpouštěné látky. Takto získaná jádra rostou pomocí difúze rozpouštěných látek z roztoku na jejich povrch, dokud nedosáhnou konečné velikosti. Aby bylo dosaženo monodisperzity, je třeba tyto dvě fáze od sebe oddělit a nukleaci v růstové fázi potlačit. Tuto situaci znázorňuje křivka I (Obrázek 2)[7].



Obrázek 2 Mechanismus tvorby uniformních částic v roztoku: křivka I: jedna nukleace a uniformní růst difúzí; křivka II: nukleace, růst a agregace menších podjednotek; křivka III: mnohonásobná nukleace a růst zrání [7]

Další možnost, jak lze připravit uniformní částice představuje mnohonásobná nukleace. Uniformity se v tomto případě dosahuje pomocí procesu samozaostření růstu. Tento děj lze pozorovat na křivce III (Obrázek 2) [7].

Uniformní částice je možné také získat agregací mnohem menších podjednotek bez využití kontinuálního růstu difúzí, což znázorňuje křivka II (Obrázek 2) [7].

### ***Koprecipitace***

Koprecipitace (srážení) je nejjednodušší metodou přípravy magnetických nanočástic. Tuto metodu lze jednoduše experimentálně zrealizovat, navíc nevyžaduje použití nebezpečných materiálů [8]. Existují dvě hlavní metody, využívající procesu koprecipitace. V první metodě je suspenze hydroxidu železnatého postupně oxidována různými oxidačními činidly [7].

V druhé metodě se oxidy železa ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nebo  $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) připravují zráním stechiometrické směsi železnatých a železitých solí ve vodném prostředí. Koprecipitace má dvě fáze. V případě, že máme přesycený roztok, dojde k tvorbě krystalizačních zárodků. Potom zárodky pomalu rostou, díky difuzi rozpuštěných látek na povrch krystalu. Tímto způsobem je možné syntetizovat velké množství nanočástic. Lze však těžko kontrolovat rozložení velikosti částic. Rozložení velikosti částic je potřeba provádět ve fázi tvorby zárodku [6]. Bylo prokázáno, že vliv na velikost částic má jak poměr  $\text{Fe}^{3+}:\text{Fe}^{2+}$  iontů, tak volba zásady (KOH, NaOH a  $\text{NH}_4\text{OH}$ ). S rostoucím pH, iontovou silou nebo poměrem  $\text{Fe}^{3+}:\text{Fe}^{2+}$  iontů klesá velikost částic [9, 10]. Tyto parametry ovlivňují chemické složení povrchu částice a tím i její elektrostatický náboj. Za těchto podmínek částice magnetitu vznikají agregací primárních částic tvořených v  $\text{Fe}(\text{OH})_2$  gelu. Takto řízená agregace umožňuje růst kulovitých krystalických částic [8].

Princip reakce popisuje následující rovnice:



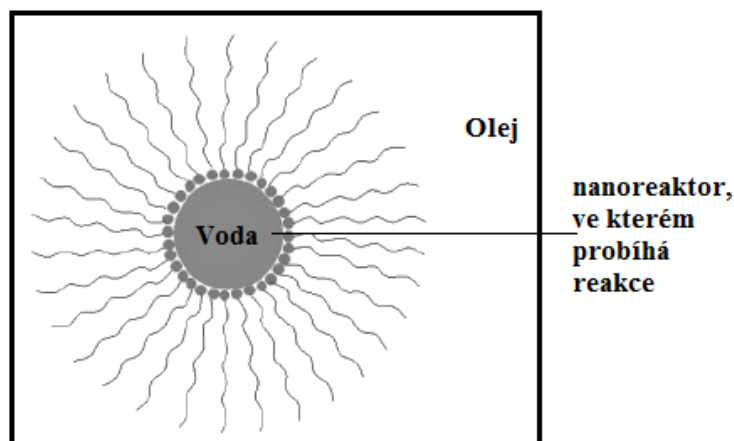
Tuto metodu lze modifikovat tak, že se provádí například v přítomnosti dextranu nebo jakékoliv jiné látky, která zapříčiní biokompatibilitu magnetické nanočástice. Díky tomu je tato metoda velmi vhodná pro *in vivo* aplikace [7].

### ***Emulzní technika (technika reverzních micel)***

Mikroemulze voda-v-oleji (V/O; roztok reverzních micel) jsou průhledná, izotropická a termodynamicky stabilní kapalná media. V těchto systémech jsou jemné mikrokapky vodné fáze zachyceny do shluků povrchově aktivních molekul rozpuštěných v kontinuální olejové fázi (Obrázek 3). Mikro dutiny stabilizované povrchově aktivními látkami vytváří vězníci efekt, který částice omezuje v nukleaci, růstu a aglomeraci [7].

Prostředí potřebné k provedení této metody je tvořeno amfoterními povrchově aktivními látkami, které vytvářejí struktury obrácených micel v nepolárních rozpouštědlech, v kleci proteinu apoferitinu, v dendrimerech, v cyklodextrinech a ve fosfolipidových membránách, které tvoří s nanočásticemi oxidu železa vezikuly sloužící jako pevné nosiče [6].

Povrchově aktivní látky mohou spontánně formovat nanokapky o různých velikostech, micely (1 – 10 nm) nebo emulze vody v oleji (10 – 100 nm). Pomocí této techniky jsou vodné roztoky solí železa enkapsulovány povrchově aktivními látkami a jsou tak odděleny od organického roztoku [6].



**Obrázek 3** Struktura reverzních micel. Jádrem reverzní micely je hydrofilní a může rozpouštět ve vodě rozpustné látky [11].

Výhodou této techniky je to, že lze získat velmi rozmanité nanočástice. Základní parametry částic a složení jsou ovlivňovány změnami vlastností a množství povrchově aktivních látek, olejové fáze nebo změnou reakčních podmínek [6].

#### ***Hydrotermální a vysokoteplotní reakce***

Tyto reakce jsou prováděny ve vodném prostředí v reaktorech a autoklávech, kde tlak může být vyšší než 13,8 MPa a teplota může být nad 200 °C [6].

Existují dva způsoby tvorby feritů v hydrotermálních podmínkách: hydrolýza a oxidace nebo neutralizace směsných hydroxidů kovů. Tyto dva způsoby se liší pouze tím, že soli železa se používají jen v prvním případě [6].

Rozklad prekursorů železa v přítomnosti horkých organických povrchově aktivních látek umožňuje výhodnou kontrolu velikosti vzorku, úzkou distribuci velikosti a dobrou krystalinitu individuálních a dispergovatelných magnetických nanočástic oxidů železa. Magnetické nanočástice připravené touto metodou mohou být využity v biomedicínských aplikacích, jako jsou magnetická rezonance, magnetická separace buněk nebo magnetorelaxometrie [7].

Termálním rozkladem lze připravit magnetické nanočástice o velikosti okolo 4 nm, ale aby bylo dosaženo velikosti až 20 nm, je potřeba použít metodu očkování [7].

#### ***Reakce Sol-Gel***

Tento proces je založen na hydroxylaci a kondenzaci molekulárních prekursorů v roztoku, které pochází ze solu nanočástic. Následná kondenzace a anorganická polymerizace vede k tvorbě trojrozměrné sítě kovů zvané vlhký gel [6].

Hlavními parametry ovlivňujícími kinetiku, růstové reakce, hydrolýzu, kondenzaci a tedy i strukturu a vlastnosti gelu jsou druh rozpouštědla, teplota, povaha a koncentrace použitého solného prekursoru, pH a míchání [6].

#### ***Metody polyolů***

Jde o velmi slibnou techniku přípravy uniformních nanočástic, která může být využita v biomedicínských aplikacích jako je magnetická rezonance. Jemné kovové částice lze získat redukcí rozpouštěných kovových solí a přímým srážením kovů z roztoku obsahující polyol [7].

Polyoly mají vysokou dielektrickou konstantu a díky tomu se chovají jako rozpouštědla schopná rozpustit anorganické látky. Dále mají polyoly relativně vysoké body varu, což nám umožňuje pracovat ve velkém teplotním rozsahu. Polyoly slouží jako redukční činidla a také jako stabilizátory, kontrolující růst částic a zabraňující mezičásticové agregaci [6].

V tomto procesu je výchozí látka suspendována v tekutém polyolu, suspenze je pak míchána a zahřívána až k teplotě varu použitého polyolu. Během této reakce je kovový prekurzor rozpuštěn v diolu, tvoří meziprodukt a je následně redukován, čímž se vytvoří kovová jádra, z kterých vznikají kovové nanočástice [6].

Tato metoda má několik výhod. Povrch připravené magnetické nanočástice je obalen hydrofilními polyolovými ligandy, tím pádem mohou být nanočástice dispergovány ve vodném prostředí a jiných polárních rozpouštědlech. Relativně vysoká reakční teplota tohoto systému upřednostňuje částice s vyšší krystalinitou a tedy i s vyšší magnetizací. Rozložení velikosti částic je mnohem užší než v předchozích případech [6].

Průměrnou velikost kovových částic lze kontrolovat naočkováním reakčního média cizími částicemi (heterogenní nukleace). Nukleace a růst tak můžou být zcela odděleny a výsledkem jsou pak uniformní částice [7].

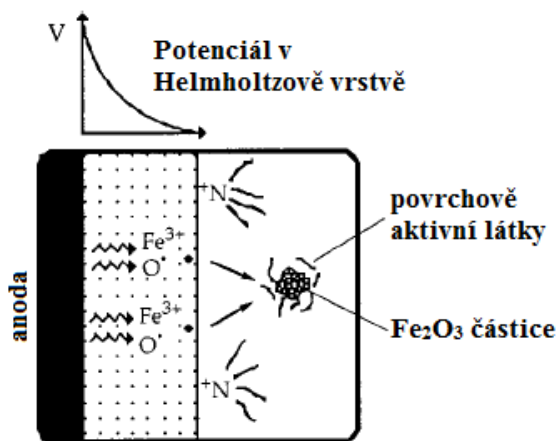
### ***Průtoková injekční analýza***

Technika se skládá z kontinuálního nebo segmentovaného míchání reagentů v režimu laminárního proudění v kapilárním reaktoru. Výhodami této metody jsou reprodukovatelnost, díky pístovému toku a laminárním podmínkám, vysoká homogenita, a možnost dobré kontroly procesu [6].

### ***Elektrochemické metody***

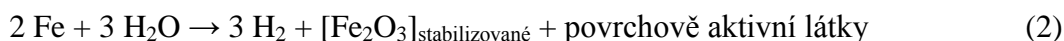
Nanočástice maghemitu lze připravit z železné elektrody ve vodném roztoku DMF a kationických povrchově aktivních látek [6].

Systém pro přípravu stabilizovaných  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  nanočástic tvoří železná anoda a platinová katoda ve formě folie (Obrázek 4). Jako elektrolyt slouží roztoky tetraalkylamonné soli v N,N-dimethylformamidu (DMF) a méně než 5 % demineralizované vody. Použité proudové hustoty se pohybují od několika málo jednotek po desítky  $\text{mA} \cdot \text{cm}^{-2}$  a tomu odpovídající potenciál od 1,8 do 4 V. Za těchto podmínek se anodicky oxiduje voda. Během elektrolýzy se tvoří hnědé sraženiny. Sraženiny se promyjí pomocí DMF a několikrát centrifugují, aby se odstranily zbytky tetraalkylamoniových řetězců [12].



**Obrázek 4 Schéma přípravy stabilizovaných  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  nanočástic [12]**

Proces popisuje následující rovnice:



Reakce probíhající na anodě:



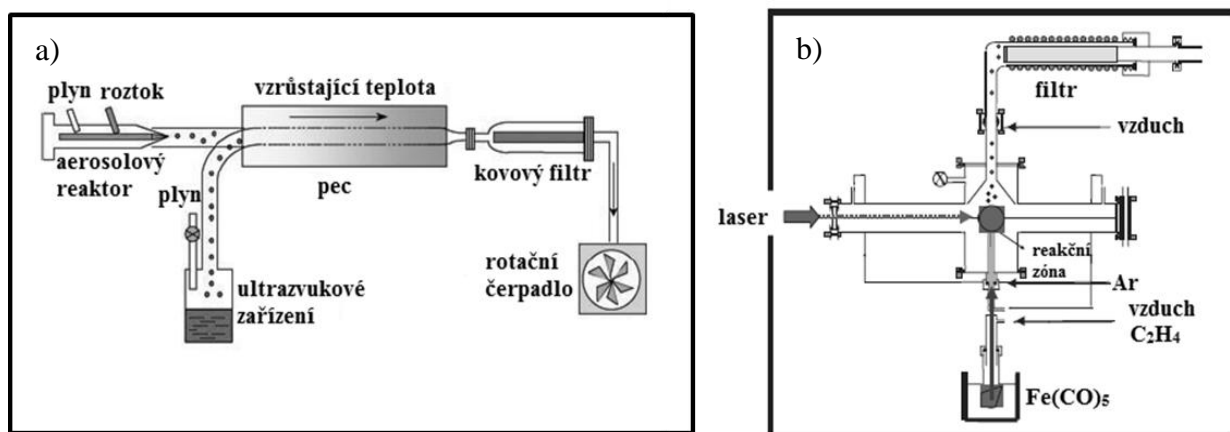
Při této metodě je velikost částic, která se pohybuje mezi 3-8 nm, přímo řízena pomocí hustoty vloženého proudu a výsledné částice jsou stabilizovány jako koloidní suspenze v kationických povrchově aktivních látkách. Absorpce dlouhých řetězců tetraalkylamoniových solí zabráňuje shlukování částic v organickém prostředí [12].

### **Aerosolové metody**

Tyto procesy probíhají kontinuálně a umožňují vysokou produktivitu. Mezi aerosolové metody patří sprejová a laserová pyrolýza. Jsou to vynikající techniky umožňující přímou a kontinuální produkci magnetických nanočástic. Sprejovou pyrolýzou vznikají velmi jemné nanočástice, které následně agregují. Zatímco při použití laserové pyrolýzy nanočástice téměř neagregují [6, 7].

Sprejová pyrolýza je proces, při kterém se pevné částice získávají sprejováním roztoku, obsahujícím železité soli s redukčním činidlem, do série reaktorů. V nich aerosol rozpuštěných látek kondenzuje a rozpouštědlo se odpaří. Následuje sušení a termolýza sražených částic při vyšší teplotě (Obrázek 5 a). Touto metodou vznikají mikroporézní látky, které nakonec sintrováním vytvoří pevné částice. Sprejovou pyrolýzou vznikají jemně dispergované částice předvídatelných tvarů, velikosti a složení. Výhodou této metody je jednoduchost, rychlost a kontinuálnost [7].

Jako plyn při laserové pyrolýze se používá oxid uhličitý. Tato metoda zahrnuje zahřátí tekoucí směsi plynů kontinuální vlnou  $\text{CO}_2$  laseru, který zahajuje a udržuje chemickou reakci. Při určitém tlaku a výkonu laseru je dosaženo kritické koncentrace jader, což vede k homogenní nukleaci částic, které jsou dále transportovány inertním plynem k filtru. V reakční zóně se překrývá vertikální proud reakčního plynu s horizontální laserovým paprskem. Reakční zóna je bezpečně oddělaná od stěn komory (Obrázek 5 b). Toto uspořádání poskytuje ideální prostředí pro nukleaci nanočástic (okolo 5 nm) s menším znečištěním a užší distribucí velikosti než při použití konvenčních termálních metod [7].



**Obrázek 5 Schematická znázornění pro sprejovou (a) a laserovou (b) pyrolýzu [7]**

### **Sonolýza**

Ultrazvuk zvyšuje energii chemické reakce. Děje se tak skrze proces akustické kavitace: tvorba, růst a implozivní kolaps bublin v tekutině. Během kavitacího kolapsu nastane intenzivní ohřev. Vytvoří se tak lokalizovaná horká místa o teplotě zhruba 5 000 °C, tlaku asi 50 MPa a délce života několika mikrosekund. Rázové vlny tvořené kavitací, vytváří v suspenzích vysokorychlostní mezičásticové srážky, což umožňuje roztavení většiny kovů. Výjimečnou vlastností ultrazvuku je schopnost vytvářet čisté, vysoce reaktivní povrchy kovů [13].

Touto metodou lze připravit superparamagnetické nanočástice oxidu železitého (SPIO).

Vysoká teplota, vytvořená rychlým zhroucením akustické kavitace, umožňuje konverzi železitých solí na magnetické nanočástice. Sonolýza vodného roztoku  $\text{Fe}(\text{CO})_5$  za přítomnosti dodecylsulfátu sodného vede k tvorbě stabilních hydrosolů amorfních nanočástic  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  [6].

### ***Produkce tzv. magnetosomů magnetickými bakteriemi***

Magnetické bakterie syntetizují jednotné nanočástice magnetitu obalené lipidovými membránami. Těmito bakteriemi jsou *Magnetospirillum magneticum*, rodu AMB-1. Bakteriální částice magnetitu se snadno oddělují a čistí z rozrušených magnetických bakterií pomocí magnetu. Každá tato částice má svoji vlastní magnetickou doménu magnetitu a velmi snadno se dispergují ve vodném roztoku díky svým membránám. Právě tato organická membrána a ještě pravidelná morfologie částic odlišuje bakteriální magnetické nanočástice od uměle vyrobených magnetických nanočástic [14].

AMB-1 mají dvě respirační cesty k přenosu elektronů. Jedna k aerobnímu růstu využívá  $\text{O}_2$  jako konečného akceptoru elektronů. Tato cesta k tvorbě magnetitu nevede. Druhá cesta využívá jako konečný akceptor elektronů dusičnan a tedy vyžaduje nižší redoxní potenciál, což je příznivé pro tvorbu magnetitu. Proto se k optimalizování výroby magnetických nanočástic využívá regulace kyslíku. Omezený obsah kyslíku v plynné fázi posiluje buněčný růst a tedy i produkci bakteriálních magnetických nanočástic [14].

### **2.2.2 Stabilizace magnetických nanočástic**

Magnetické nanočástice mají tendenci se shlukovat ve větší celky, proto je nutné je stabilizovat. Stabilizaci lze provádět dle potřeby následných aplikací různými způsoby.

Roztoky magnetických nanočástic se chovají jako hydrofilní koloidní soly. Jsou záporně nabitě v zásaditém prostředí a kladně nabitě v kyselém prostředí. Jejich stabilita závisí na povaze a koncentraci protiiontů prostředí [10].

V zásaditém prostředí polarizované nebo vysoce nabitě kationty, jako je například amonný kationt, kationty alkalických kovů nebo kovů alkalických zemin, podporují flokulaci. Zatímco slabě polarizované kationty, jako je tetramethylamonný iont, podporují stabilitu roztoku [10].

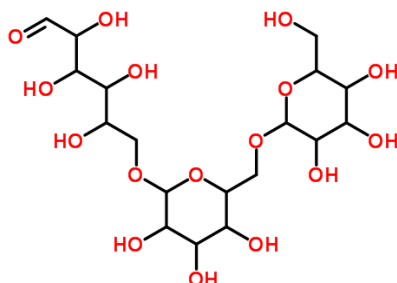
V kyselém prostředí převládá činnost aniontů. Slabě polarizované anionty, jako jsou například  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$  a  $\text{ClO}_4^-$ , jsou slabá flokulační činidla, musejí být tedy přidány ve velkém přebytku, aby tvořily sraženiny [10].

### ***Stabilizace polymerním obalem***

Při přípravě nanočásticových nosičových systému je třeba brát v úvahu fyzikálně-chemické a biologické procesy, které nastanou po jejich vpravení do těla. Po té, co jsou nanočástice nitrožilně vpraveny do krevního oběhu, jsou velmi rychle obaleny například plazmatickými proteiny nebo glykoproteiny. Tento proces se nazývá opsonizace. Opsonizované nanočástice (a jiné tělu cizí látky) jsou snadno rozpoznány hlavním obranným systémem v těle – retikuloendoteliálním systémem (mononukleárním fagocytárním systémem). Klíčovou roli při odstraňování opsonizovaných nanočástic hrají makrofágové (Kupfferovy) buňky jater (také makrofágy sleziny a cirkulující makrofágy). Obvykle je proces zachycení a rozpoznání částic velmi účinný, může být však ovlivněn velikostí nebo ještě ve větší míře povrchovými vlastnostmi nanočástic. Částice, které mají vysoce hydrofobní povrch, jsou obaleny složkami plazmy a okamžitě odstraněny z krevního oběhu. Zatímco částice, které mají povrch spíše hydrofilní, jsou schopné tomuto obalení odolávat různě dlouho a tak jsou z krevního oběhu odstraněny pomaleji. V mnoha situacích Kupfferovy buňky představují velkou překážku pro nosičové systémy, aby se dostaly k problematickým místům a mimo cévní prostory. Výše diskutovaná problematika působila výraznou překážku, kterou bylo nutné překonat pro další aplikace těchto materiálů v oblasti medicíny. Jedno z možných řešení představuje adsorpce vhodného polymeru na povrchovou vrstvu částice. Takto dojde rovněž ke sterickému zvýšení stability studovaného systému. Jako velmi výhodné se jeví zejména hydrofilní polymery [15].

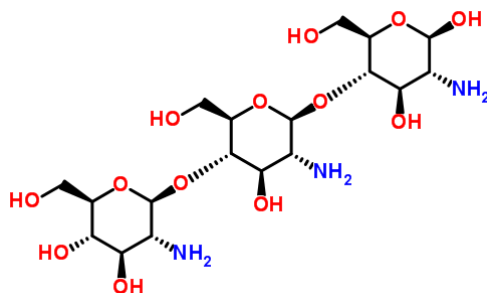
Typickými příklady hydrofilních polymerů, které se používají pro zvýšení stability magnetických částic, jsou škrob, dextran, chitosan, kyselina hyaluronová, polyvinylalkohol, polyethylenglykol aj [6].

*Dextran* je polysacharid složený z  $\alpha$ -D-glukopyranózových jednotek s různou délkou řetězce a různým větvením (Obrázek 6). Jako ochranný polymer se využívá hlavně díky jeho biokompatibilitě [6].



Obrázek 6 Strukturní vzorec dextran [16]

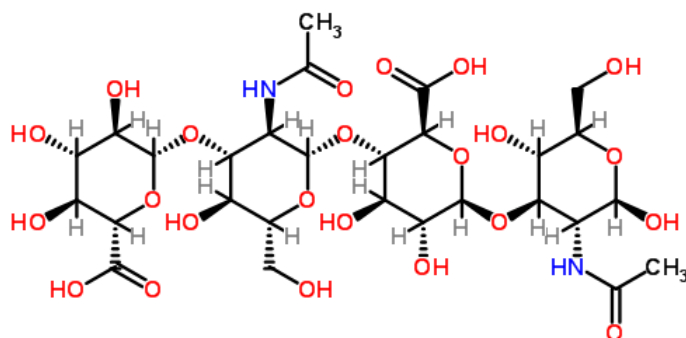
*Chitosan* (poly(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-2-deoxy-D-glukan) je alkalický, netoxický a hydrofilní polyaminosacharid s mnoha významnými biologickými (biodegradabilita, biokompatibilita a bioaktivita) a chemickými vlastnostmi. Je polykationický, ve vodném prostředí bobtná, ve své struktuře obsahuje reaktivní skupiny, jako jsou hydroxylové a aminové skupiny (Obrázek 7) [17]. Hydrofilní povaha a biokompatibilita je do značné míry způsobena přítomností aminoskupiny [18]. Chitosan a jeho deriváty mají široké uplatnění v medicíně, farmacii a biotechnologii [17]. Chitosan má schopnost tvořit film, je mechanicky silný, má vysokou permeabilitu vůči vodě, je citlivý vůči chemickým modifikacím a je levný. Magnetické nanočástic obalené chitosanem mohou být využity k imobilizaci enzymu, k odstranění kovových iontů a k mnoha dalším průmyslovým procesům [17].



Obrázek 7 Strukturní vzorec (1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-2-deoxy- $\beta$ -D-glukanu [19]

*Hyaluronová kyselina* (HYA) patří mezi glykosaminglykany složené z disacharidových jednotek D-glukuronové kyseliny a N-acetyl-D-glukosaminu (Obrázek 8). Je hlavní složkou tkání obratlovců, tělních tekutin a také hraje významnou roli při různých biologických procesech, včetně adheze a migrace buněk, vrozené imunity a hojení ran. Navíc je HA vysoce biokompatibilní a snadno dostupná, je tedy vhodné ji využít v oblasti cílené distribuce léčiv. Kyselina hyaluronová se dokáže vázat s receptory CD44, které jsou produkovány nádorovými buňkami, proto se kyselina hyaluronová využívá k cílené léčbě rakoviny [20].





Obrázek 8 Strukturní vzorec kyseliny hyaluronové [21]

*Polyethylenglykol* (PEG) je syntetický, hydrofilní, ve vodě rozpustný, biokompatibilní polymer. Využitím PEG se zvyšuje biokompatibilita disperzí oxidů železa [6]. PEG je široce využívaný v biologických výzkumech, tkáňovém inženýrství a jiných biomedicínských aplikacích. PEG se skládá z hydrofobních částí a hydrofilních konců. Pevným zakotvením molekul PEG na povrchu je nanočástice stericky stabilizována, což zlepšuje stabilitu částic v biologickém prostředí. Jeho široké uplatnění je způsobeno následujícími výhodami: 1) je snadno vylučován ledvinami; 2) s vodou má nízkou mezifázovou energii; 3) zabraňuje objemovému efektu krve; 4) má neimunogenní a neantigenní vlastnosti. Kromě toho bylo zjištěno, že nanočástice potažené PEG mohou interagovat s buněčnými membránami, což zvyšuje buněčnou odpověď. Další studie prokázaly, že doba krevního oběhu se zvyšuje se zvyšující se molekulovou hmotností PEG (od 1 900 do 20 000 Da) [22].

*Polyvinylalkohol* (PVA) je také syntetický, hydrofilní, biokompatibilní, netoxický, snadno dostupný a levný polymer. PVA snižuje aglomeraci nanočástic a umožňuje větší tvorbu monodisperzních nanočástic [6].

### 2.2.3 Charakterizace magnetických nanočástic

Magnetické nanočástice lze charakterizovat různými metodami. Mezi základní metody patří UV-VIS a FT-IR spektrometrie, elektronová či optická mikroskopie, rentgenová difrakce a metody dynamického a elektroforetického rozptylu světla.

#### UV-VIS spektrometrie

Při průchodu elektromagnetického záření vzorkem jsou některé vlnové délky absorbované molekulami vzorku. Energie záření je přenesena do vzorku, jehož molekuly následně přecházejí do excitovaného energetického stavu. Během stanovování UV-VIS spektra je intenzita záření dopadajícího na měřený vzorek ( $I_0$ ) porovnávána s prošlým zářením ( $I$ ). Následně je stanoveno množství absorbovaného záření ( $A$ ) z Lambert-Beerova zákona [23]:

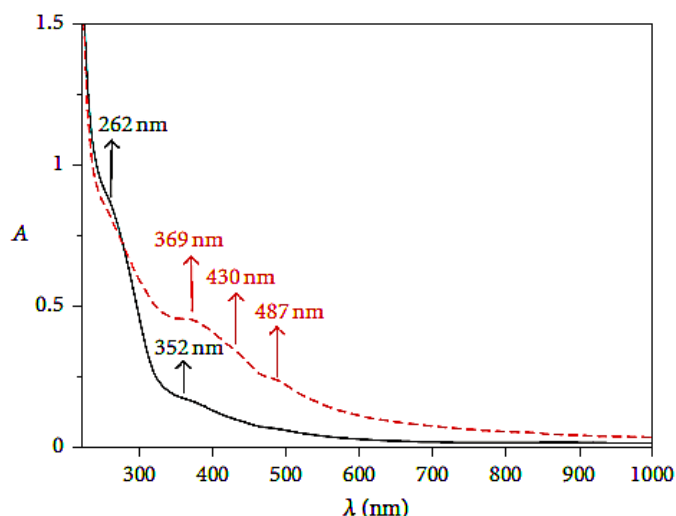
$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (4)$$

kde  $\varepsilon$  je molární absorpční koeficient dané látky,  $c$  je molární koncentrace absorbující látky a  $l$  je optická dráha v kyvetě. Ultrafialová oblast se pohybuje v rozmezí vlnové délky 200–400 nm. Viditelná oblast se nachází při 400–800 nm. Výhodou této metody je rychlost a rovněž i nízká cena jednotlivých měření. Pro určité funkční skupiny je velmi specifická a citlivá [24].

Obrázek 9 znázorňuje UV-VIS absorpční spektra Fe nanočástic rozpuštěných ve vodě před a po vystavení nanočástic vzduchu. Na optickém spektru měřeném ihned po naplnění vzorku v inertní atmosféře (černá křivka) můžeme pozorovat jasný pík při 352 nm a druhý při 262 nm. Pík při 352 nm je pravděpodobně způsoben kolektivním kmitáním povrchových



plazmonů. Spektrum měřené na vzduchu (červená křivka) vykazuje nové absorpční pásy, které vznikly v důsledku oxidace jednotlivých nanočástic oxidu železa [25].



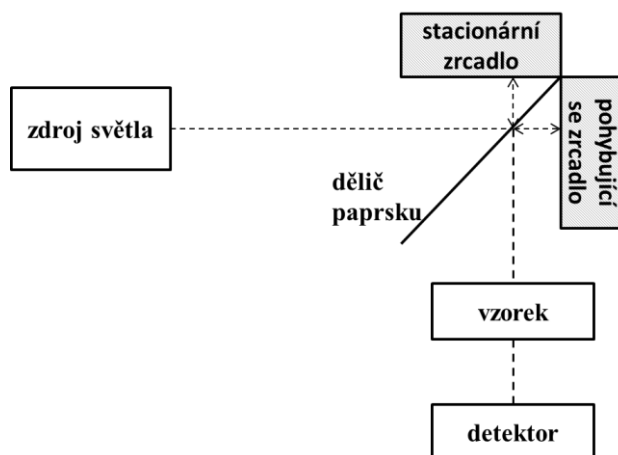
Obrázek 9 UV-VIS absorpční spektrum Fe nanočástic rozptýlených ve vodě před (černá křivka) a po vystavení účinku vzdušné oxidace (červená křivka) [25]

### *Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FT-IR)*

Podstatou metody je interakce elektromagnetického záření z infračervené oblasti ( $12\,500\text{--}20\text{ cm}^{-1}$ ) se vzorkem. Z hlediska aplikací je nejvýznamnější tzv. střední infračervená oblast v rozsahu vlnočtů  $4\,000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ . Infračervené záření má větší vlnovou délku a tím pádem menší energii než viditelné záření. Nízká energie infračerveného záření již tedy nedokáže měnit elektronové stavy molekuly (excitovat elektrony), dochází pouze ke změnám vibračních a rotačních stavů [26].

Obvykle se tato metoda využívá ke stanovení velmi malých množství vzorků. Uplatňuje se při kvalitativních stanovení různých funkčních skupin. Pro kvantitativní analýzu je potřeba k sestavení kalibrační křivky dobře charakterizovaných standardů [24].

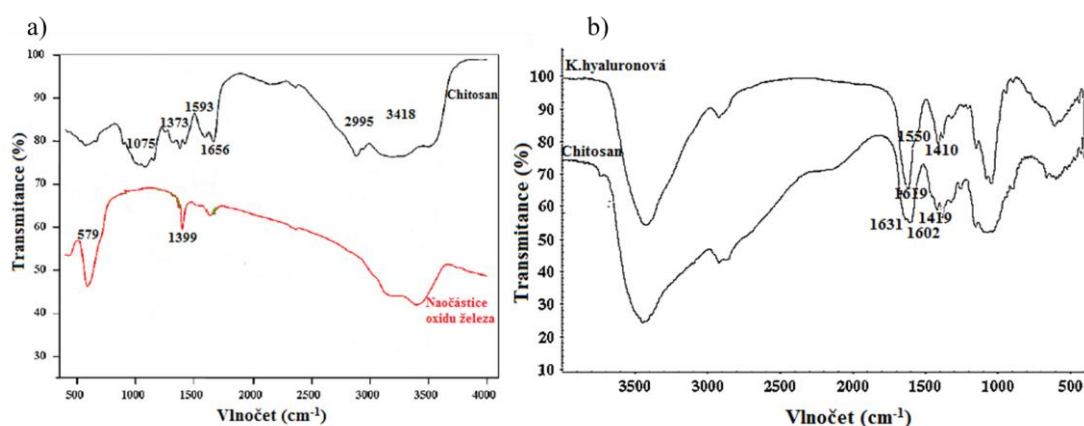
K této metodě se používá Michelsonův interferometr (Obrázek 10), který je konstruován tak, že je světlo rozděleno do dvou paprsků pomocí děliče paprsků. Jeden paprsek dopadá na stacionární zrcadlo a odráží se zpět k děliči. Druhý paprsek dopadá na pohybující se zrcadlo a odráží se také zpět k děliči. Oba paprsky jsou pak rekombinovány a pokračují přes vzorek k detektoru. Průchod světla přes interferometr je analyzován v referenčním časovém úseku [24].



Obrázek 10 Schéma Michelsonova interferometru

Je-li vzorek v pevné fázi, tak se obvykle volí metoda KBr tablet. Tato metoda spočívá v tom, že se velmi malé množství vzorku (cca 5 mg) zhomogenizuje např. v achátové misce s větším množstvím KBr (cca 100 mg). Vylisováním tablety při tlaku asi 200 kPa se vytvoří tzv. sklovitá modifikace KBr. Při průchodu infračerveného záření tedy dochází pouze k malým ztrátám intenzity záření způsobeným odrazem [27].

Nanočástice oxidu železa, kvůli oxidové struktuře vykazují silné pásy v nízkofrekvenční oblasti pod  $800\text{ cm}^{-1}$  (Obrázek 11 a) [28]. V FT-IR spektru pro kyselinu hyaluronovou (Obrázek 11 b) jsou charakteristické píky při  $1\,619\text{ cm}^{-1}$ ,  $1\,550\text{ cm}^{-1}$  a  $1\,410\text{ cm}^{-1}$ , které představují valenční vibrace karbonylových skupin, amidové vazby a symetrické valenční vibrace derivátů karboxylových skupin. Na spektru chitosanu (Obrázek 11 b) lze pozorovat absorpční karbonylové skupiny při  $1\,631\text{ cm}^{-1}$ . Charakteristické píky při  $1\,602\text{ cm}^{-1}$  a  $1\,419\text{ cm}^{-1}$  znázorňují přítomnost aminoskupin a aminových solí [29].



Obrázek 11 FT-IR spektra: a) FT-IR spektra chitosanu a nanočástic oxidu železa; b) FT-IR spektra k. hyaluronové a chitosanu [28, 29].

### ***Skenovací a transmisní elektronová mikroskopie (SEM, TEM)***

Existují dva typy elektronové mikroskopie – skenovací elektronová mikroskopie (SEM) a transmisní elektronová mikroskopie (TEM). V případě SEM je obraz tvořen pomocí sekundárního signálu – odražených nebo sekundárních elektronů. Sekundární signál vzniká interakcí primárního svazku s povrchem vzorku [30].

Při TEM se využívá velmi tenký vzorek (do tloušťky 100 nm). Materiál je zahříván na vysokou teplotu, je mu tedy dodávána dostatečná energie potřebná k termoemisi elektronů. Kontrast vzniká absorpcí některých elektronů v závislosti na tloušťce a složení vzorku nebo rozptýlením elektronů pod malými úhly, jejichž velikost závisí na složení vzorku [30].

Tyto metody je vhodné použít v případě, že velikost částic ve vzorku je v rozmezí 10 nm – 1  $\mu\text{m}$ . SEM se využívá ke studiu kapalin nebo polymerů citlivých na teplotu. Uplatňuje se také při rentgenové/elementární analýze. Je to kvalitativní technika. TEM se používá vždy, když je potřeba polymer analyzovat více do hloubky. Pomáhá nám pozorovat fázovou morfologii polymeru [24].

### ***Rentgenová difrakční analýza (XRD)***

Rentgenová difrakční analýza je měřicí metoda, která nám podává informace o struktuře pevných materiálů. Každou krystalickou látku je možné identifikovat díky jejímu specifickému difraktogramu. Tato metoda vychází z interakce rentgenového záření s elektrony nacházejícími se v pružném (bezfotonovém) rozptylu [31].

Vzhledem k tomu, že meziatomové vzdálenosti v krystalu jsou na úrovni rentgenové vlnové délky, tak vázané elektrony působí jako difrakční mřížka. XRD udává vzdálenost oblastí s nejvyšší elektronovou hustotou, což je vzdálenost od jedné krystalové roviny ke druhé. Tato

vzdálenost bývá označována jako  $d$ -vzdálenost, kterou je možné vypočítat ze základní rovnice Braggova zákona:

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin \theta \quad (5)$$

kde  $\lambda$  je rentgenová vlnová délka,  $n$  je hlavní kvantové číslo,  $d$  je vzdálenost mezi zvolenými krystalovými rovinami a  $\theta$  je Braggův úhel [32].

### ***Dynamický rozptyl světla (DLS)***

Dynamický rozptyl světla je metoda, která na základě Brownova pohybu částic měří jejich velikost. Částice je laserem osvětlena a následně je analyzována fluktuace intenzity rozptýleného světla v čase. Částice suspendované v kapalině se na základě Brownova pohybu neustále pohybují, jde o náhodné srážky částic s molekulami kapaliny, jimiž jsou částice obklopené. Významnou roli při metodě DLS hraje fakt, že se malé částice pohybují rychle a velké částice zase pomaleji. Tato souvislost je popsána Stokes-Einsteinovou rovnicí:

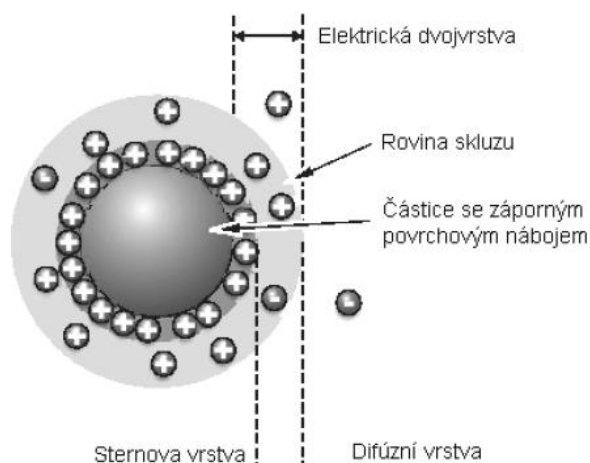
$$D^0 = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad (6)$$

$D^0$  je difuzní koeficient,  $k$  je Boltzmannova konstanta ( $k = 1,380\,6 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$ ),  $\eta$  je viskozita kapaliny a  $r$  je hydrodynamický poloměr kulové částice, která se pohybuje v disperzním prostředí.

Základním výstupem získaným touto metodou je intenzitní distribuce velikosti částic. Z ní pak lze generovat i objemovou distribuci [31, 34].

### ***Elektroforetický rozptyl světla (ELS)***

Metoda elektroforetického rozptylu světla pomocí stanovení elektroforetické pohyblivosti získává hodnotu zeta potenciálu, který se ve Sternově modelu elektrické dvojvrstvy (Obrázek 12) nachází na rovině skluzu částice.



**Obrázek 12 Sternův model elektrické dvojvrstvy [31].**

Na základě velikosti zeta potenciálu je možné určit potenciální stabilitu koloidního systému. Disperzní systém je stabilní, jestliže se jeho zeta potenciál nenachází v rozmezí od + 30 mV do - 30 mV [31].

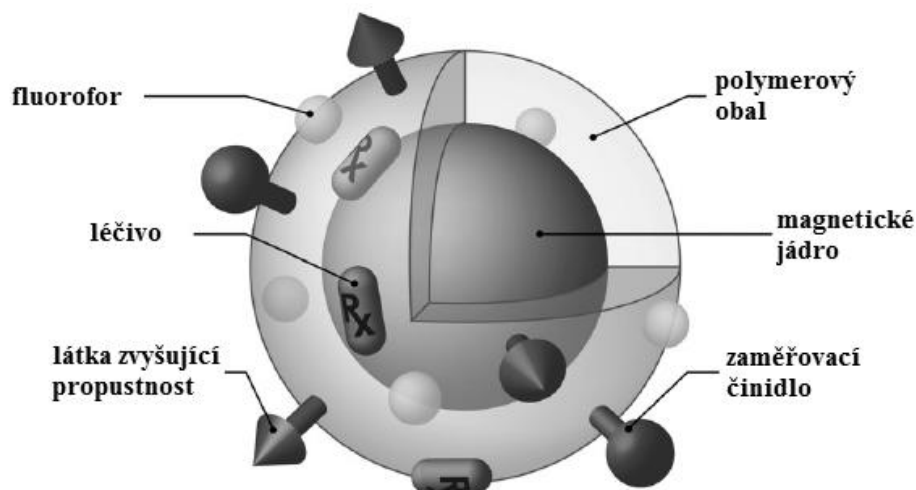
### **2.2.4 Využití magnetických nanočástic jako nosičových systémů léčiv**

Využití magnetických nanočástic v biomedicínských aplikacích je velmi široké. Lze je využít jak v terapii, tak v diagnostice. V terapii se využívají k distribuci léčiv, hypertermii/termální ablaci, radioterapii kombinované s magnetickou rezonancí, k léčbě

onemocnění spojených s poruchami pohybového systému a anemických chronických onemocnění ledvin. Zatímco v diagnostice lze magnetické nanočástice použít *in vivo* při magnetické rezonanci anebo také *in vitro* k průzkumu, třídění buněk, bioseparaci, enzymové imobilizaci, imunologickým testům, transfekci a čištění [35].

Vzhledem k hlavní náplni této práce, která představuje optimalizaci přípravy magnetických částic pro distribuci léčiv, je další výčet využití magnetických nanočástic zaměřen zejména na tuto oblast.

Díky unikátním vlastnostem a schopnosti fungovat na buněčné a molekulární úrovni biologických interakcí, jsou magnetické nanočástice aktivně zkoumány v cílené aplikaci léčiv po více než třicet let. Hlavním významem cílené distribuce léčiv a cílené farmakoterapie je dopravit léčivo přímo do ohniska onemocnění za různých podmínek a tím léčit přímo v místě problému bez vedlejších účinků na těle. Největší naděje se vkládají do „inteligentních“ nanočástic, které jsou tvořeny magnetickým jádrem (nejen aby bylo možné částice nasměrovat do blízkosti cíle, ale také kvůli hypertermii nebo kvůli uvolnění léčiva podpořené teplem), rozpoznávací vrstvou (na kterou jsou připojeny vhodné receptory) a léčivem (absorbovaným uvnitř pórů nebo umístěným ve vnitřních dutinách nanočástic). Nanočásticový systém může obsahovat fluorofor, aby bylo možné distribuci léčiva pozorovat pomocí magnetické rezonance (Obrázek 13) [36, 37].



**Obrázek 13 Magnetická nanočástice vybavená různými ligandy [37]**

K magnetickému zacílení je léčivo nebo terapeutický radionuklid navázaný na magnetickou sloučeninu. Následně je systém zaveden do těla a pomocí magnetického pole (může být interně implantované permanentní magnet nebo externě aplikované pole) je zacílen do problematické oblasti. V závislosti na aplikaci částice následně uvolní léčivo, nebo působí lokálním účinkem (záření z radioaktivních mikrokuliček nebo hypertermie magnetickými nanočásticemi). Uvolnění léčiva může probíhat jednoduchou difúzí nebo prostřednictvím enzymatických mechanismů nebo změnou fyziologických podmínek jako je pH, osmolalita a teplota. Uvolnění léčiva může být také spuštěno magneticky [35].

V poslední době si cílená distribuce léčiv získala velkou pozornost. Magnetické nanočástice umožňují lokální distribuci léčiv a jejich řízené uvolňování po delší dobu, snižují riziko vedlejších účinků a v případě jejich využití nedochází k poškození zdravé tkáně a plýtvání s léky. V následujících odstavcích je popsáno, jakým způsobem je možné magnetické nanočástice modifikovat a jaké je jejich konkrétní následné využití v biomedicínských aplikacích.

V práci [38] autoři využili pro tvorbu stabilizační vrstvy tetraethylorthosilikát a aminosilan, díky kterému byly na povrchu nanočástic vytvořené aminoskupiny. K takto modifikovaným

nanočásticím byl přes glutaraldehyd konjugován moxifloxacin (antibiotikum). Nakonec byl systém označen radioaktivním jódem  $^{131}\text{I}$ . Byla pozorována biologická afinita takto připravených nosičových systémů, jejich schopnost začlenit se do buněk, cytotoxicita a možnost využití jako zobrazovacích sond. Konjugací moxifloxacinu s magnetickými nanočásticemi byl zvýšen příjem antibiotika do buňky

Autoři práce [39] využili k obalení částic polyethylenglykol. Částice jsou tak méně náchylné k ataku makrofágu a vydrží déle v krevním řečišti. Tyto nanočástice byly připravené, aby zajistili snadnější dopravu léčiv a jejich umístění v těle pomocí vnějšího magnetického pole. Neutrální polymerní vrstva neovlivňuje elektrokinetické chování částic, ale nabízí možnost uchycení léčiva. Na nosičový systém byly adsorbovány dva druhy protinádorových léčiv (5-fluorouracil a doxorubicin). Experimentálně bylo dokázáno, že 5-fluorouracil se uvolňuje velmi pomalu při pH 7,4 v pufové roztoku. Po 43 hodinách se uvolní pouze 13 % z celkového množství adsorbovaného 5-fluorouracilu. U doxorubicinu probíhá uvolňování rychleji a za stejný čas se uvolní téměř 90 % z celkového množství doxorubicinu navázaného na nanočástice.

Superparamagnetické nanočástice oxidů železa byly modifikované v práci [40] triethoxysilanem a kyselinou thioglykolovou, aby byl povrch nanočástic opatřen thiolovými skupinami. Cílem studie bylo prozkoumat imobilizaci protilátek. Aktin, anti-aktin a peroxidáza křenu selského (HRP) byly postupně imobilizovány na nanočásticích. Vazba protilátek na superparamagnetické nanočástice je alternativou western blottingu, který vyžaduje přípravu SDS-polyakrylamidového gelu, elektroforézu a přenos na membránu.

Ve studii [41] byl uveden nový nosičový systém, který se skládá z nanočástic oxidů železa (IO), které byly vrstvu po vrstvě („layer-by-layer“, LBL) potaženy mléčným proteinem kaseinem (CN). Jako modelové molekuly léčiv byly zvoleny doxorubicin (DOX) a indocyaninová zeleň (ICG). Tyto molekuly byly včleněny do vnitřní polymerové vrstvy a postupně obaleny kaseinem. Výsledné nanočásticové systémy (CN-DOX/ICG-IO) byly stabilní v kyselém žaludečním prostředí, kde se nachází žaludeční proteáza. Navázané léčivo se uvolnilo, když vnější kaseinová vrstva byla postupně degradována účinkem žaludeční proteázy v simulovaných střevních podmínkách. Tyto jedinečné vlastnosti zajišťují zachování biologické aktivity léčiv, a tím zvyšují účinnost distribuce léčiv. *Ex vivo* experimenty ukázaly, že nanostruktury LBL-CN-DOX-IO, vylepšují přemístění doxorubicinu přes mikrokly a jeho absorpci v tenkém střevě. *In vivo* pozorování myši, kterým byly orálně podány nanostruktury LBL-CN-ICG-IO, dále potvrdilo, že uvedené nosičové systémy by mohly projít žaludkem bez významného rozkladu a následně se akumulovat v tenkém střevě. Takže nosičové systémy CN-DOX/ICG-IO představují slibné orálně podávané nosičové systémy léčiv, zvláště pro léky málo rozpustné ve vodě nebo rozložitelné v žaludečním prostředí

V publikaci [42] se vědci zabývali problémem distribuce léčiv přes hematoencefalickou bariéru. Studie prokázala, že polymerové (polybutylkyanoakrylát) mikrobublinky (MB), obsahující ve svém obalu ultra malé superparamagnetické nanočástice oxidů železa (USPIO), můžou zároveň zprostředkovávat a pozorovat permeaci přes hematoencefalickou bariéru. Jestliže se USPIO-MB vystaví transkraniální ultrazvukovým pulzům, zničí se. Vznikají tak akustické síly, které způsobují propustnost cév. Zároveň jsou USPIO uvolněny z MB obalu, přestupují přes permeabilizovanou hematoencefalickou bariéru a akumulují se v extravaskulární mozkové tkáni. Je možné tedy provést neinvazivní magnetickou rezonanci podávající informaci o rozsahu otevření hematoencefalické bariéry. Právě takovéto prostředky, které jsou schopny zároveň časově i prostorově ovládat otevírání hematoencefalické bariéry zvenčí, jsou velmi důležité k individualizaci a zlepšení zásahů v případě Alzheimerovy choroby, Parkinsonovy choroby, mozkových nádorů. Tento druh onemocnění vyžaduje systematickou léčbu, která zahrnuje vysokomolekulární léčiva (jimiž jsou růstové faktory a protilátky; které vzhledem k intaktní hematoencefalické bariéře

nemohou efektivně dosáhnout cílového místa po *in vivo* injekci). Vývoj materiálů a metod umožňujících bezpečnou, účinnou, ideálně i zobrazitelnou distribuci léčiv přes hematoencefalickou membránu má velmi významný potenciál při léčbě onemocnění centrální nervové soustavy

### **2.2.5 Bezpečnost a toxicita magnetických nanočástic v biomedicínských aplikacích**

Diskutovat toxicitu magnetických nanočástic je velmi obtížné, protože na ni má vliv mnoho faktorů, včetně dávky, chemického složení, způsobu podávání, velikosti, biologické odbouratelnosti, rozpustnosti, farmakokinetiky, biodistribuce, povrchové chemie, tvaru, struktury a mnohé další. Obecně v případě toxicity hraje hlavní roli zejména velikost, povrch, tvar, složení a obalový materiál magnetických nanočástic. Modifikace povrchu magnetických nanočástic biokompatibilními polymery se často využívá jako jedna z cest, jak minimalizovat toxikologický efekt [35].

Železo je kov tělu vlastní, který je nezbytný pro život a to především díky své schopnosti snadno přijímat a darovat elektrony při výměně mezi železnatými a železitými ionty. Celkové množství železa v těle je přísně regulováno, protože jeho nadbytek může být extrémně toxický. Železo uvolněné z magnetických nanočástic je metabolizováno v retikuloendoteliálním systému a následně využito k tvorbě krevních buněk nebo pomocí ledvin vyloučeno. Vysoké hodnoty volných iontů železa pocházejících z magnetických nanočástic mohou způsobit nerovnováhu v tělní homeostáze a může to vést k aberantní buněčné odpovědi, včetně poškození DNA, oxidačnímu stresu, epigenetickým událostem a zánětlivým procesům. Obvyklá injekční dávka magnetických nanočástic pro biomedicínské aplikace odpovídá 1,25 – 5 % celkového obsahu železa v těle, takto velká dávka železa může mít toxické účinky. Je tedy potřeba vyvinout způsoby jak zabránit možné toxicitě magnetických nanočástic, aby mohly být prakticky využitelné [43].

Magnetické nanočástice založené na oxidech železa jsou méně toxické než ty nanočástice založené na stříbře nebo zinku. Avšak při *in vivo* podání nanočástic oxidu železitého byl zjištěn oxidační stres v plicích krys. V případě magnetických nanočástic, tak jako u všech biomedicínských objevů, je potřeba zvážit všechna rizika a výhody [35].

Magnetické nanočástice, které mají být potenciálně využity jako nosičové systémy léčiv, je nutné analyzovat z hlediska jejich toxicity (akutní, subakutní, chronickou, teratogenitu a mutagenitu) v buněčných a zvířecích modelech, hematokompatibilitu, biologický rozklad (kdykoliv je to možné), imunogenitu a farmakokinetiku (distribuce v těle, metabolismus, biologická dostupnost, eliminace, organspecifická toxicita) před zahájením preklinického testování [35].

Několik různých studií potvrzuje, že magnetické nanočástice podané ve vhodných dávkách nevyvolávají toxicitu. Ve studii [44] autoři podávali myším intraperitoneálně magnetické nanočástice obalené oxidem křemičitým po dobu čtyř týdnů. Téměř všechny orgány byly zkoumány v závislosti na čase. Většina magnetických nanočástic byla zachycena v játrech a po té přerozdělena do ostatních orgánů (např. slezina, plíce, srdce a ledviny). Inhalace magnetických nanočástic byla popsána ve studii [45]. Vdechnuté nanočástice menší než 50 nm se dostaly k mozku a varlatům po té, co obešly hematoencefalickou a hematotestinální bariéru, tedy bez vyvolání jakékoliv zjevné toxicity.

### 3 Experimentální část

#### 3.1 Použité chemikálie

- chlorid železitý, p.a. (Sigma Aldrich), CAS: 7705-08-0
- tetrahydrát chloridu železnatého, p.a. (Fluka), CAS: 13478-10-9
- tetramethylamonium hydroxid (Sigma Aldrich), CAS: 75-59-2
- polyvinylalkohol, p.a. (Fluka), CAS: 9002-89-5
- chitosan, p.a. (Aldrich), CAS: 9012-76-4
- kyselina hyaluronová, p.a. (Contipro Group s.r.o.), CAS: 904-61-9
- destilovaná voda milli-Q

#### 3.2 Použité přístroje

- Magnetická míchačka (Lavat)
- Laboratorní odstředivka (Hettich ZENTRIFUGEN)
- Ultracentrifuga – miniSpin (Eppendorf)
- Sušárna (Venticell)
- Lis na tablety pro FT-IR
- Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments)
- UV-VIS spektrofotometr – U-3900H (Hitachi)
- FT-IR spektrometr – Nicolet iS5 (Thermoscientific)
- Rentgenový práškový difraktometr – PANalytical Empyrean
- Skenovací elektronový mikroskop JEOL JSM-7600F (Peakbody, USA)

#### 3.3 Příprava magnetických nanočástic (FeNP)

Příprava magnetických nanočástic (FeNP) byla provedena pomocí koprecipitační metody (bližší popis lze nalézt v kapitole 2.2.1 Koprecipitace). Mechanismus vzniku magnetických částic je znázorněn v následující rovnici:



Pro účely přípravy magnetických nanočástic v této bakalářské práci byly připraveny vodné roztoky chloridu železitého ( $\text{FeCl}_3$ ) a tetrahydrátu chloridu železnatého ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ). Tyto roztoky byly smíchány dle požadovaného poměru látkových množství  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  iontů. Následně byla vždy reakční směs ohřata na 60 °C. K horké směsi byl přidáván po kapkách roztok NaOH. Postupně docházelo k tvorbě tmavé sraženiny (Obrázek 14).



Obrázek 14 Směs před vysrážením (nalevo) a po vysrážení (napravo)

Takto připravené směsi byly dvě hodiny míchány na magnetické míchačce. Vzniklé částice byly odděleny od disperzního prostředí při 4 000 ot./min a 20 °C po dobu 20 min. Po centrifugaci byl supernatant slit. Sedimenty byly sušeny do druhého dne při 60 °C.

### 3.4 Optimalizace podmínek přípravy FeNP

V rámci této části práce byly připraveny FeNP dle postupu uvedeném v kapitole 3.3. Hlavním cílem této kapitoly bylo ověření vlivu vzájemného poměru látkových množství  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  iontů (zvolené poměry: 1:1, 1:2 a 1:4) a dále také vlivu koncentrace použitého NaOH pro srážení částic z roztoku (koncentrace NaOH:  $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ).

V první části byl nejprve studován vliv vzájemného poměru látkových množství  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  iontů. Celkový objem každé směsi byl  $150 \text{ cm}^3$  a celková koncentrace iontů železa ve směsi byla  $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Bližší detaily lze nalézt v Tabulce 1.

**Tabulka 1 Příprava magnetických nanočástic**

	<b>poměr</b>	<b>látková množství (mol)</b>	<b>navážka (g)</b>
<b><math>\text{Fe}^{2+} : \text{Fe}^{3+}</math></b>	1:1	0,075:0,075	14,911:12,166
	1:2	0,050:0,100	9,941:16,221
	1:4	0,030:0,120	5,964:19,465

Každá směs byla rozdělena na 3 díly po  $50 \text{ cm}^3$ . Bylo připraveno tedy 9 roztoků (Tabulka 2), které byly ohřáty na 60 °C. Ke každému poměru bylo po kapkách přidáváno  $20 \text{ cm}^3$  NaOH tak, aby byla každá směs  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  iontů daného poměru vysrážena vždy NaOH o třech rozdílných koncentracích.

**Tabulka 2 Označení vzorků**

<b>poměr <math>\text{Fe}^{2+}</math> a <math>\text{Fe}^{3+}</math> iontů</b>	<b>koncentrace NaOH</b>		
	$0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	$1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	$5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
1:1	$\text{Fe}(1:1)_{0,5\text{M}}$	$\text{Fe}(1:1)_{1\text{M}}$	$\text{Fe}(1:1)_{5\text{M}}$
1:2	$\text{Fe}(1:2)_{0,5\text{M}}$	$\text{Fe}(1:2)_{1\text{M}}$	$\text{Fe}(1:2)_{5\text{M}}$
1:4	$\text{Fe}(1:4)_{0,5\text{M}}$	$\text{Fe}(1:4)_{1\text{M}}$	$\text{Fe}(1:4)_{5\text{M}}$

Všechny připravené magnetické nanočástice FeNP byly charakterizovány z hlediska jejich magnetického účinku (vizuální určení za pomoci magnetu na bázi sloučenin neodymu, železa a boru – NdFeB). Dalšími zvolenými metodami charakterizace byly dynamický a elektroforetický rozptyl světla měřené pomocí Zetasizeru Nano ZS a UV-VIS spektrometrie.

### 3.5 Příprava magnetických nanočástic modifikovaných pomocí TMAH

V tomto případě byly FeNP připraveny modifikací postupu uvedeného v kapitole 3.3 na základě publikace [46]. S ohledem na výsledky optimalizace podmínek přípravy FeNP byla pro přípravu zvolena směs  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  v Milli-Q vodě v poměru 1:2 tak, aby celkový objem roztoku byl  $25 \text{ cm}^3$  a celková koncentrace iontů železa byla  $1,25 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (Tabulka 3).

**Tabulka 3 Příprava FeNP<sub>TMAH</sub>**

	<b>poměr</b>	<b>látkové množství (mol)</b>	<b>navážka (g)</b>
<b><math>\text{Fe}^{2+} : \text{Fe}^{3+}</math></b>	1:2	0,0104:0,0208	2,0709:3,3794

Ke směsi bylo po kapkách přidáno  $25 \text{ cm}^3$   $5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  roztoku NaOH. Sraženiny se nechaly usadit, roztok nad usazeninou byl slit a sraženina byla po kapkách převedena do  $35 \text{ cm}^3$  Milli-Q vody přehřáté na 80 °C. Směs se dvě hodiny míchala na magnetické



míchačce. Následně bylo přidáno po kapkách  $1,75 \text{ cm}^3$  25% roztoku TMAH (tetramethylamonium hydroxid). Po té byla směs odstředěna při 4 000 ot./min a  $20^\circ\text{C}$  po dobu 20 min. Sediment byl sušen do druhého dne při  $60^\circ\text{C}$ . V rámci práce jsou tyto částice dále značené jako  $\text{FeNP}_{\text{TMAH}}$ .

Magnetické nanočástice  $\text{FeNP}_{\text{TMAH}}$  byly obdobně jako v předchozích kapitolách charakterizovány pomocí síly jejich magnetického účinku a dále analýzou na Zetasizeru Nano ZS a UV-VIS spektrofotometru Hitachi U-3900 H.

### 3.6 Stabilizace magnetických nanočástic

#### 3.6.1 Výběr vhodné polymerní obalové vrstvy pro FeNP

Byly připraveny roztoky potřebné ke stabilizaci magnetických nanočástic, jimiž byly 1 hm.% roztok polyvinylalkoholu, 0,2 hm.% roztok chitosanu a 0,1 hm.% roztok kyseliny hyaluronové.

Pro stabilizaci byly zvoleny částice vzorku FeNP poměru 1:2 vysrážených  $5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  NaOH. Ke stabilizaci bylo vždy naváženo 10 mg nanočástic, které byly rozptýleny v pěti různých prostředích. Prvním kontrolním vzorkem byl  $1 \text{ cm}^3$  Milli-Q vody. Následně byla stejná navážka částic rozptýlena v  $1 \text{ cm}^3$  fosfátového pufru, v  $1 \text{ cm}^3$  roztoku chitosanu, v  $1 \text{ cm}^3$  roztoku polyvinylalkoholu a v  $1 \text{ cm}^3$  kyseliny hyaluronové. Připravené vzorky byly ponořeny do ultrazvukové lázně po dobu 10 minut. Roztoky nanočástic v jednotlivých prostředích (v Milli-Q vodě, v pufru, v PVA, v kyselině hyaluronové a v chitosanu) byly přefiltrovány přes stříkačkové filtry (velikost pórů  $0,2 \mu\text{m}$ ).

Tímto způsobem bylo připraveno 10 roztoků magnetických nanočástic (jedna sada nefiltrovaných roztoků a jedna sada filtrovaných roztoků), které byly následně charakterizovány pomocí UV-VIS spektrometrie na přístroji Hitachi U-3900 H. Dále byly vzorky průběžně proměřovány pomocí metod dynamického a elektroforetického rozptylu světla na přístroji Zetasizer Nano ZS, aby byla zjištěna jejich stabilita v závislosti na čase. Během 14 dní bylo měření provedeno pětkrát.

#### 3.6.2 Studium vlivu koncentrace chitosanu a molekulové hmotnosti k. hyaluronové

Pro studium vlivu koncentrace chitosanu a molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové na vlastnosti magnetických nanočástic byly připraveny roztoky chitosanu o koncentracích 0,05 hm.%, 0,1 hm.%, 0,5 hm.% a roztoky kyseliny hyaluronové o koncentraci 0,1 hm.% a molekulových hmotnostech 8-15 kDa, 130-150 kDa a 1 500-1 750 kDa (v posledním případě byly připraveny roztoky o koncentracích 0,001 hm.%, 0,05 hm.% a 0,1 hm.%).

Stabilizovány byly vzorky  $\text{Fe}(1:2)_{\text{IM}}$ . Částice byly rozetřeny v achátové misce. Navážka částic 0,005 g byla stabilizována vždy s  $10 \text{ cm}^3$  daného roztoku biopolymeru. Vzniklé roztoky byly 10 minut ponechány v ultrazvuku a následně přefiltrovány přes stříkačkové filtry (velikost pórů  $5 \mu\text{m}$  filtry).

Tímto způsobem bylo připraveno 8 roztoků (Tabulka 4, Tabulka 5), které byly následně proměřeny na Zetasizeru Nano ZS a UV-VIS spektrofotometru Hitachi U-3900 H.

**Tabulka 4 Označení vzorku pro studium vlivu koncentrace chitosanu na vlastnosti FeNP**

koncentrace (%)	označení vzorku
0,05	$\text{Fe}(1:2)_{\text{IM}} + 0,05 \% \text{ CH}$
0,1	$\text{Fe}(1:2)_{\text{IM}} + 0,1 \% \text{ CH}$
0,5	$\text{Fe}(1:2)_{\text{IM}} + 0,5 \% \text{ CH}$

**Tabulka 5 Označení vzorků pro studium vlivu molekulové hmotnosti a koncentrace kyseliny hyaluronové na vlastnosti FeNP**

molekulová hmotnost (kDa)	koncentrace (%)	označení vzorku
8-15	0,1	Fe(1:2) <sub>IM</sub> + HYA(8-15 kDa)
130-150	0,1	Fe(1:2) <sub>IM</sub> + HYA(130-150 kDa)
1 500-1 750	0,001	Fe(1:2) <sub>IM</sub> + 0,001 %HYA(1 500-1 750 kDa)
	0,05	Fe(1:2) <sub>IM</sub> + 0,05 %HYA(1 500-1 750 kDa)
	0,1	Fe(1:2) <sub>IM</sub> + 0,1 %HYA(1 500-1 750 kDa)

### 3.7 Charakterizace vybraných vzorků FeNP

#### 3.7.1 Příprava vzorků pro FT-IR analýzu

Pro charakterizaci magnetických nanočástic pomocí FT-IR analýzy byly použity částice Fe(1:2)<sub>IM</sub>, Fe(1:2)<sub>5M</sub> a FeNP<sub>TMAH</sub>. Získaná FT-IR spektra nestabilizovaných FeNP byla porovnávána se spektry vzorků připravených dle postupu uvedenému v kapitole 3.6.2.

Před FT-IR analýzou byly vzorky sušeny 24 hodin na Petriho miskách při 50 °C.

FT-IR spektra byla získána metodou KBr tablet. Pro jejich přípravu bylo vždy naváženo 5 mg studovaného vzorku a rozetřeno v achátové ve 100 mg KBr. Směs byla dána na pístek a pomocí lisu byla vytvořena tableta.

#### 3.7.2 Příprava vzorků pro XRD analýzu

Nanočástice Fe(1:2)<sub>IM</sub>, Fe(1:2)<sub>5M</sub> a FeNP<sub>TMAH</sub> byly rozetřeny v achátové misce. Od každého vzorku bylo naváženo 5 mg. Částice byly stabilizovány vždy 10 cm<sup>3</sup> 0,1 hm.% chitosanu a 0,1 hm.% kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 90-130 kDa. Bylo připraveno tedy 6 roztoků (Tabulka 6).

**Tabulka 6 Označení vzorků pro XRD analýzu**

částice	polymer	označení vzorku
Fe(1:2) <sub>IM</sub>	0,1 hm.% chitosan	Fe (1:2) <sub>IM</sub> + 0,1 % CH
	0,1 hm.% kyselina hyaluroná (90-130 kDa)	Fe(1:2) <sub>IM</sub> + HYA(90-130 kDa)
Fe(1:2) <sub>5M</sub>	0,1 hm.% chitosan	Fe (1:2) <sub>5M</sub> + 0,1 % CH
	0,1 hm.% kyselina hyaluroná (90-130 kDa)	Fe(1:2) <sub>5M</sub> + HYA(90-130 kDa)
FeNP <sub>TMAH</sub>	0,1 hm.% chitosan	Fe (1:2) <sub>TMAH</sub> + 0,1 % CH
	0,1 hm.% kyselina hyaluroná (90-130 kDa)	Fe(1:2) <sub>TMAH</sub> + HYA(90-130 kDa)

Připravené roztoky byly ponořeny na 10 minut do ultrazvukové lázně, poté zfiltrány (velikost pórů 5 µm filtry). Po dobu 20 minut byly roztoky centrifugovány při 12 000 ot./min. Supernatant byl vždy slit a usazeniny byly převedeny na Petriho misky a sušeny do druhého dne při 50 °C. Po usušení byly připravené částice rozetřeny v achátové misce na prášek.

Rentgenovou difrakční analýzou byly dále charakterizovány pouze magnetické nanočástice Fe(1:2)<sub>IM</sub>, Fe(1:2)<sub>5M</sub> a FeNP<sub>TMAH</sub> a stabilizované částice Fe(1:2)<sub>5M</sub> + 0,1 % CH, FeNP<sub>TMAH</sub> + 0,1 % CH a FeNP<sub>TMAH</sub> + 0,1 % HYA (90-130 kDa), protože jen v těchto případech bylo získáno dostatečné množství potřebné pro XRD analýzu.

Rentgenová difrakční analýza byla provedena na přístroji Empyrean od firmy Panalytical. Nastavení podmínek měření je uvedeno v Tabulce 7.

**Tabulka 7 Nastavení podmínek měření pro XRD analýzu**

Scan Axis	Gonio
Start Position [ $^{\circ}$ 2Th.]	4,99999
End Position [ $^{\circ}$ 2Th.]	90,00545
Step Size [ $^{\circ}$ 2Th.]	0,0131303
Scan Step Time [s]	95,88
Anode Material	Cu
K-Alpha1 [ $\text{\AA}$ ]	1,540598
K-Alpha2 [ $\text{\AA}$ ]	1,544426
Generator Settings	30 mA, 40 kV

### **3.7.3 Příprava vzorků pro SEM analýzu**

Skenovací elektronovou mikroskopií byly charakterizovány pouze nestabilizované částice  $\text{Fe(1:2)}_{\text{IM}}$ ,  $\text{Fe(1:2)}_{\text{5M}}$  a  $\text{FeNP}_{\text{TMAH}}$ .

Rozetřené částice byly naneseny na uhlíkovou pásku. Následně byly odděleny ty částice, které se na pásku přilepily od těch částic, které se nepřilepily. Takto připravený vzorek byl vložen do autosampleru SEM. Snímky byly pořízené pod zvětšením  $250\,000\times$ .

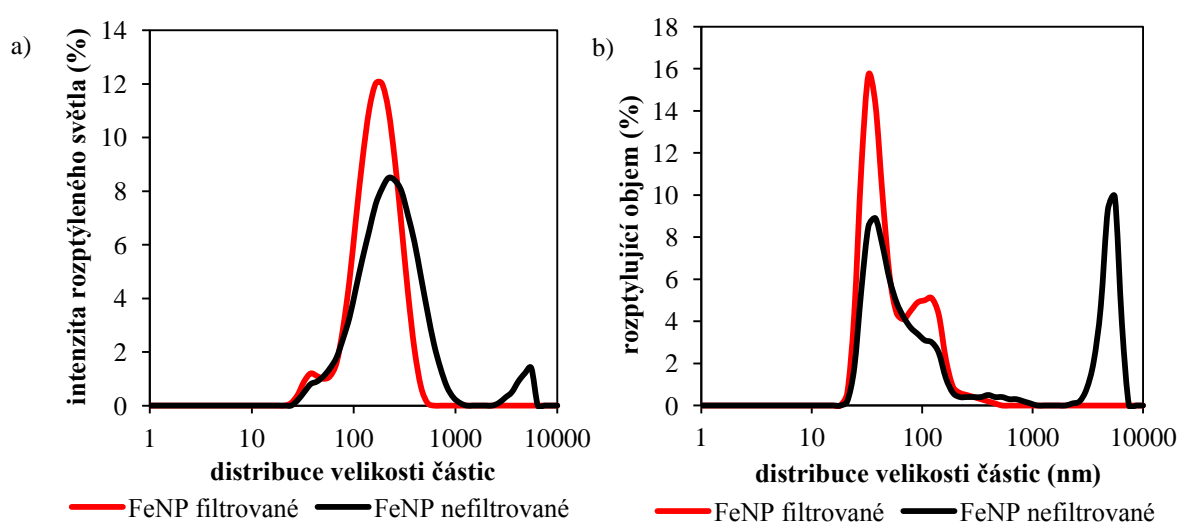
## 4 Diskuze a výsledky

### 4.1 Optimalizace přípravy magnetických nanočástic

První část bakalářské práce si kladla za cíl optimalizovat přípravu magnetických částic na bázi  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Hlavními metodami, které byly využity pro posouzení jednotlivých připravených vzorků FeNP byly dynamický a elektroforetický rozptyl světla a UV-VIS. Tyto výsledky jsou shrnuty v jednotlivých částech kapitoly 4.1.

#### 4.1.1 Vliv poměru $\text{Fe}^{2+} : \text{Fe}^{3+}$ a koncentrace NaOH

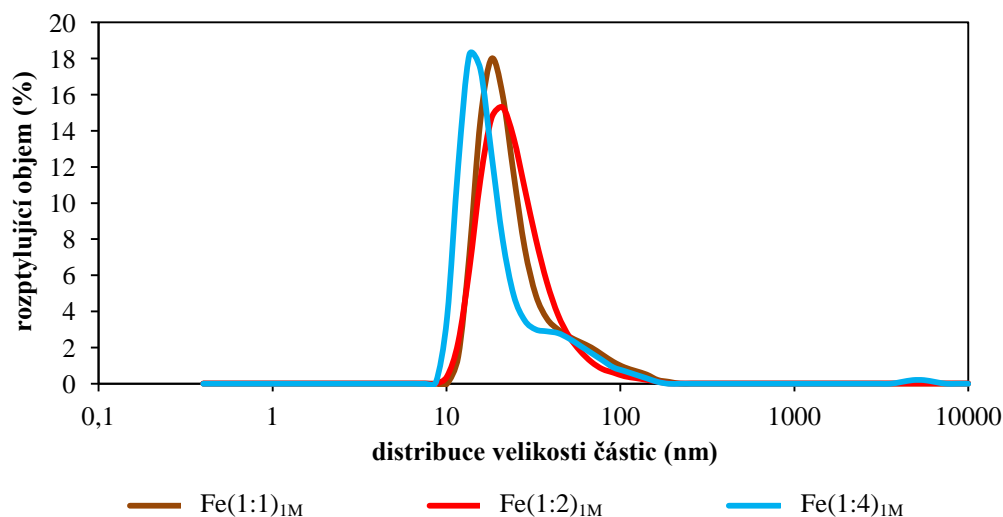
Na Obrázku 15 jsou znázorněny intenzitní a objemové distribuce pro vybraný filtrovaný a nefiltrovaný vzorek FeNP. V případě nefiltrovaných částic můžeme pozorovat pík v oblasti 5 500 nm, který odpovídá agregátům FeNP respektive nerozpuštěným shlukům FeNP. Aby nebyly následné analýzy touto agregací ovlivňovány, byly všechny následné vzorky vždy filtrovány.



**Obrázek 15** Intenzitní (a) a objemové (b) distribuce srovnávající velikosti filtrovaných a nefiltrovaných částic

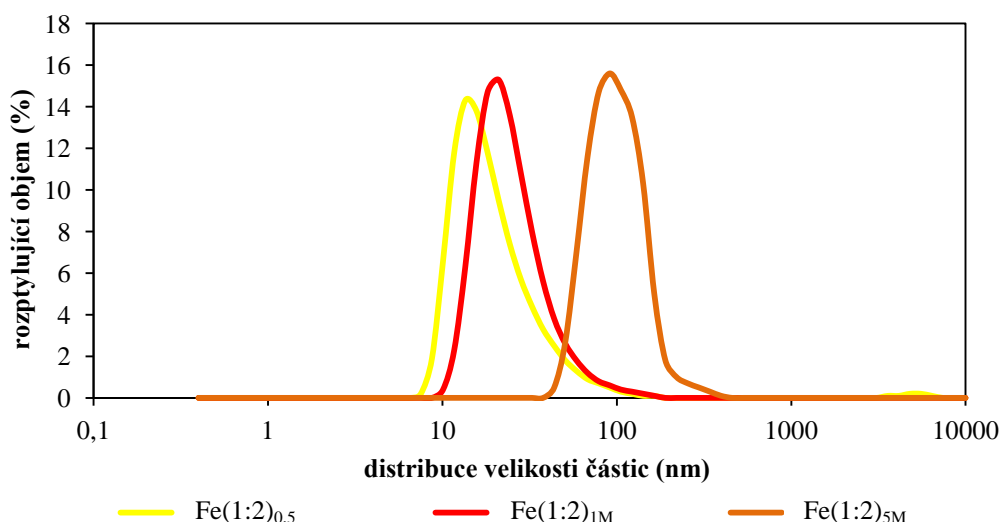
V případě intenzitních distribucí jsou výrazně zvýhodněny velké částice. Stačí, aby jich ve vzorku bylo jen stopové množství, aby se v distribuci projevily. Magnetické nanočástice jsou obecně malé (10–20 nm [3]). Z těchto důvodů je vhodnější využít objemovou distribuci částic, která studovaný systém mnohem lépe charakterizuje. V této práci jsou tedy dále uváděny pouze distribuce objemové.

Následně byl v práci studován vliv poměru  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  iontů. Pro tyto účely byly zvoleny tři různé poměry a to 1:1, 1:2 a 1:4. Následující graf (Obrázek 16) znázorňuje objemovou distribuci srovnávající tyto poměry. Mezi jednotlivými distribucemi velikostí částic pro dané poměry nejsou výrazné rozdíly. Na základě rešerše literatury [46] byl pro následující experimenty v rámci bakalářské práce zvolen poměr  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  iontů 1:2.

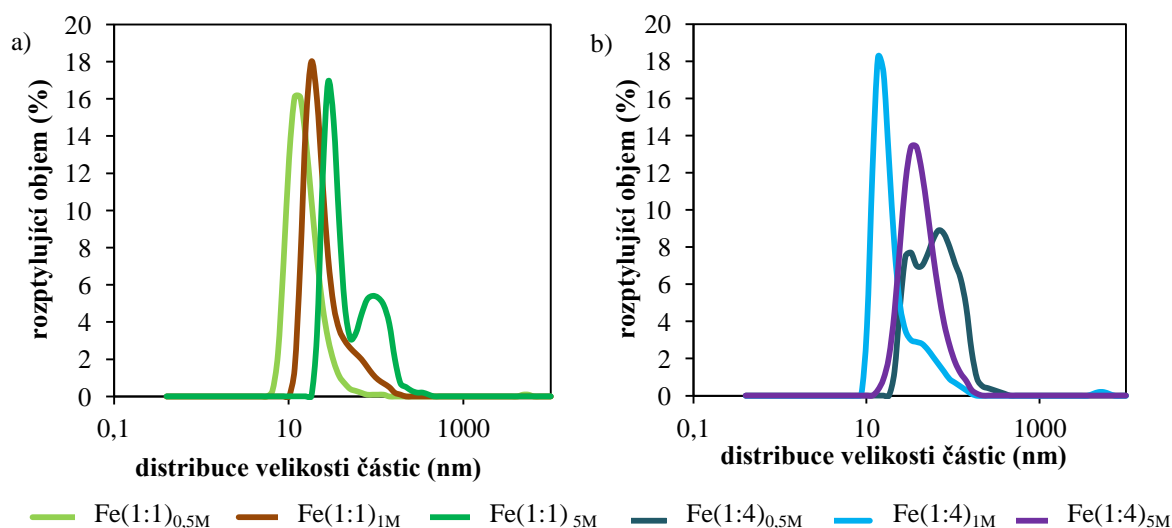


**Obrázek 16** Objemové distribuce částic: srovnání poměrů  $\text{Fe}^{2+}:\text{Fe}^{3+}$  s koncentrací  $\text{NaOH } 1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

Druhým studovaným parametrem v rámci optimalizace přípravy FeNP byla koncentrace roztoku NaOH, použitého ke srážení FeNP ze směsi  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  iontů. Objemové distribuce velikostí částic FeNP získané metodou dynamického rozptylu světla pro částice vysrážené hydroxidem sodným o různých koncentracích ( $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) jsou znázorněny níže (Obrázek 17, Obrázek 18).



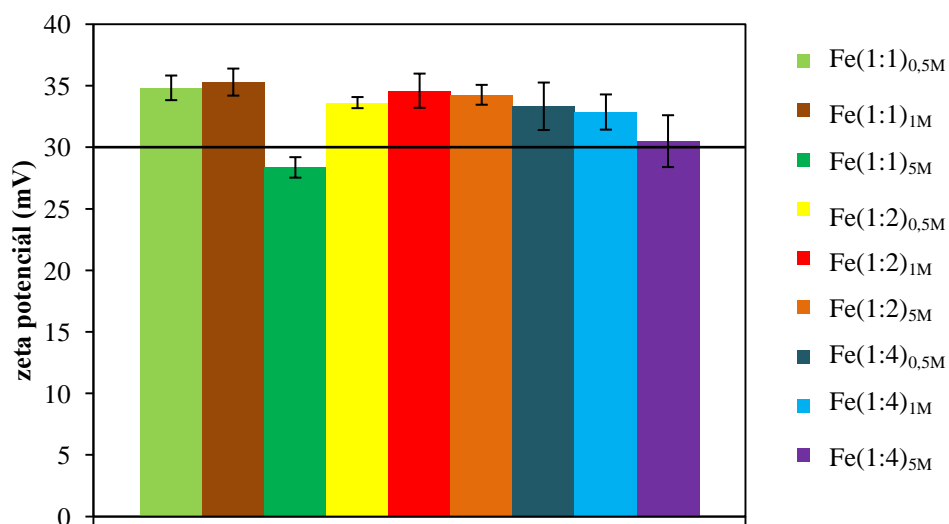
**Obrázek 17** Objemová distribuce částic: srovnání vlivu koncentrace NaOH na částice v poměru  $\text{Fe}^{2+}:\text{Fe}^{3+} 1:2$



**Obrázek 18** Objemová distribuce částic: srovnání vlivu koncentrace NaOH na částice v poměru  $\text{Fe}^{2+}:\text{Fe}^{3+}$  1:1 (a) a 1:4 (b)

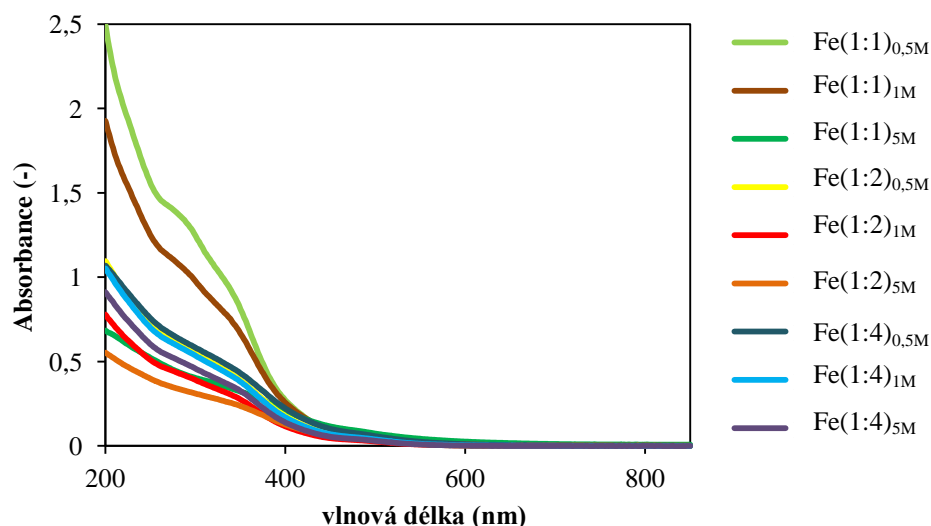
Z výsledků vyplývá, že pro všechny poměry  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  iontů s rostoucí bazicitou použitého NaOH roste velikost částic.

Metodou elektroforetického rozptylu světla byly zjištěny zeta potenciály všech připravených částic, které vypovídají o elektrostatické stabilitě vzorků. V případě, že je zeta potenciál v rozmezí  $-30$  až  $+30$  mV, vzorek je nestabilní, v opačném případě mají částice dostatečně velký náboj, který brání v jejich vzájemné agregaci. Z grafu (Obrázek 19) můžeme pozorovat, že téměř všechny částice jsou stabilní. Pouze částice  $\text{Fe}(1:1)_{5\text{M}}$  jsou pod hranicí stability (černá čára) a částice s poměrem  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  iontů  $\text{Fe}(1:4)_{5\text{M}}$  jsou těsně nad hranicí stability. Zatímco největší zeta potenciál vykazují částice  $\text{Fe}(1:1)_{1\text{M}}$



**Obrázek 19** Závislost hodnot zeta potenciálu na poměru  $\text{Fe}^{2+}:\text{Fe}^{3+}$  a na koncentraci NaOH

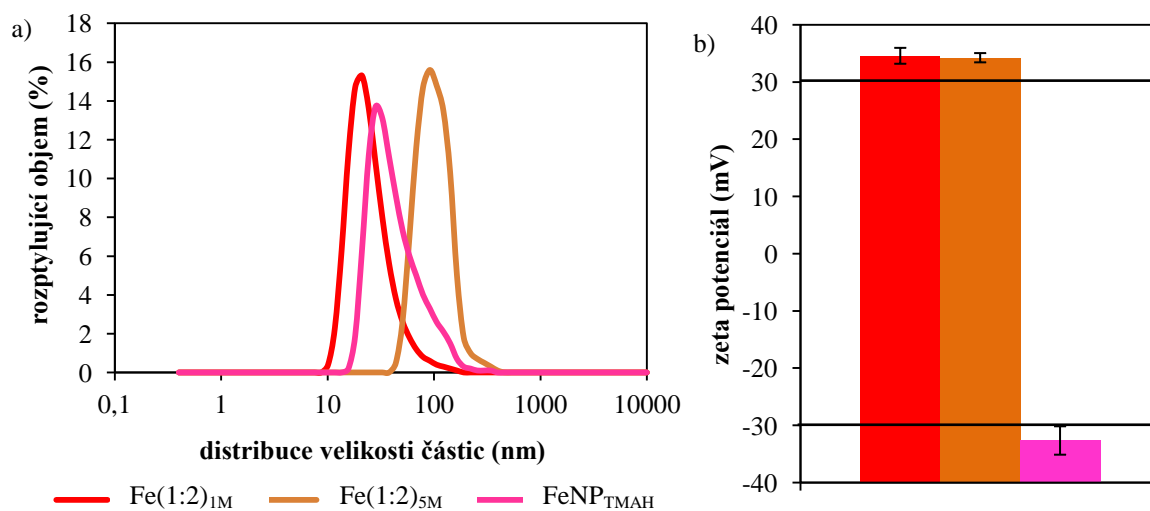
Pomocí dat z UV-VIS spektrometrie byla sestrojena absorpční spektra (Obrázek 20) všech připravených vzorků magnetických nanočástic. Srovnáme-li naměřené spektrum se spektrem publikovaným v literatuře (Obrázek 9), můžeme pozorovat jistou podobnost. Můžeme tedy usoudit, že magnetické částice se podařilo připravit.



Obrázek 20 Absorpční spektrum: srovnání poměrů  $\text{Fe}^{2+} : \text{Fe}^{3+}$  a koncentrací NaOH

#### 4.1.2 Příprava magnetických nanočástic modifikovaných pomocí TMAH

Na základě literatury [46] byly připraveny magnetické nanočástice stabilizované pomocí tetramethylamonium hydroxidu ( $\text{FeNP}_{\text{TMAH}}$ ). Tyto částice byly rovněž proměřeny pomocí dynamického a elektroforetického rozptylu světla a UV-VIS spektrometrie. V následujících grafech (Obrázek 21, Obrázek 22) je uvedeno jejich srovnání s částicemi  $\text{Fe}(1:2)_{1\text{M}}$  a  $\text{Fe}(1:2)_{5\text{M}}$ .

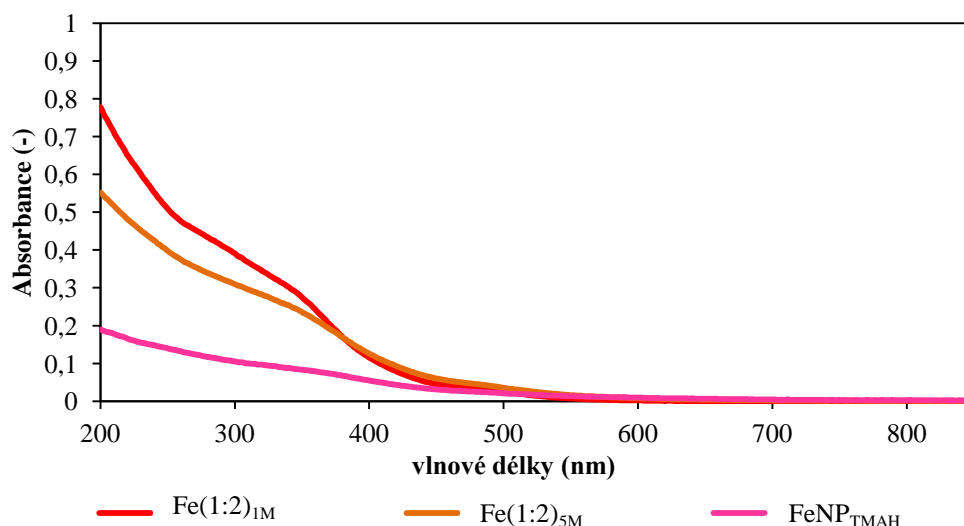


Obrázek 21 Objemová distribuce (a) a graf zeta potenciálů (b)  $\text{FeNP}_{\text{TMAH}}$  a jejich srovnání s vybranými vzorky FeNP

Připravené  $\text{FeNP}_{\text{TMAH}}$  vykazují obdobnou distribuci jako částice připravené v předchozí kapitole. V porovnání se vzorkem  $\text{Fe}(1:2)_{5\text{M}}$  je distribuce posunutá směrem k nižším hodnotám velikostí částic, ačkoliv byl u těchto vzorků použit stejný poměr  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  i stejná koncentrace NaOH.

$\text{FeNP}_{\text{TMAH}}$  na rozdíl od zbylých dvou typů částic vykazují zápornou hodnotu zeta potenciálu, která je způsobena tetramethylamonnými ionty, jež zvyšují alkalitu prostředí (viz kapitola 2.2.2) [10].

UV-VIS spektra (Obrázek 22) znázorňují podobnost mezi jednotlivými typy magnetických nanočástic. V případě  $\text{FeNP}_{\text{TMAH}}$  je jejich absorbance velmi nízká.



Obrázek 22 UV-VIS spektrum FeNP<sub>TMAH</sub> ve srovnání s vybranými vzorky FeNP

#### 4.1.3 Srovnání magnetického účinku

Přiložením NbFeB magnetu k jednotlivým vzorkům připravených magnetických částic byl vizuálně zjištěn jejich magnetický účinek (Tabulka 8). Jako nejvíce magnetické se jevíly částice FeNP<sub>TMAH</sub> a částice Fe(1:2)<sub>5M</sub>.

Tabulka 8 Srovnání magnetického účinku nanočástic železa

	0,5 mol · dm <sup>-3</sup> NaOH	1 mol · dm <sup>-3</sup> NaOH	5 mol · dm <sup>-3</sup> NaOH
1:1	malý	střední	vysoký
1:2	střední	malý	vysoký
1:4	vysoký	střední	střední
FeNP <sub>TMAH</sub>			vysoký

S ohledem na výsledky všech výše uvedených charakteristik byly pro stabilizaci a další práci vybrány magnetické nanočástice Fe(1:2)<sub>IM</sub>, resp. Fe(1:2)<sub>5M</sub> a FeNP<sub>TMAH</sub>.

## 4.2 Stabilizace magnetických nanočástic

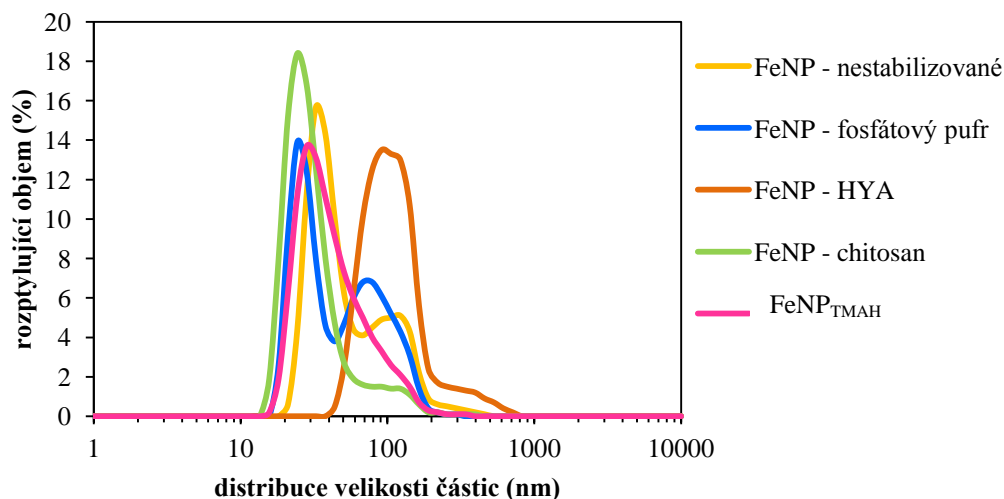
### 4.2.1 Stabilizace pomocí PVA, chitosanu, k. hyaluronové, fosfátového pufru a TMAH

Nejprve byla provedena stabilizace různými materiály, a to polyvinylalkoholem, chitosanem, kyselinou hyaluronovou, fosfátovým pufrem a tetramethylamonium hydroxidem.

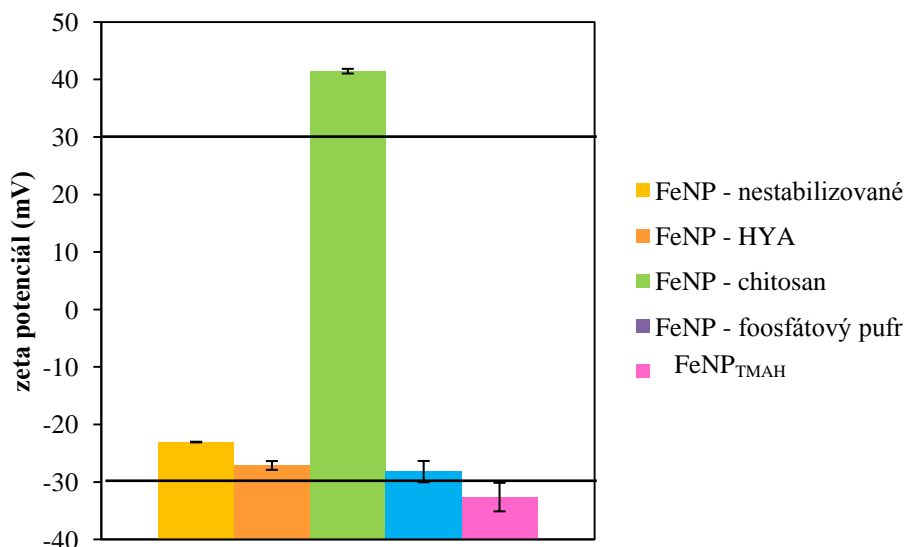
Obalené částice byly proměřeny jak ve filtrované, tak i v nefiltrované formě. V případě nefiltrovaných roztoků docházelo ke shlukování částic (viz. diskuze na začátku kapitoly 4.1.1). Částice obalené PVA se shlukovaly natolik, že nebyly do dalších měření zahrnuty.

U filtrovaných roztoků již agregaci nepozorujeme (Obrázek 23). Z grafu srovnávajícího zeta potenciál filtrovaných roztoků (Obrázek 24) můžeme opět pozorovat vynikající stabilitu chitosanu ( $41,433 \pm 0,404$  mV). FeNP<sub>TMAH</sub> jsou na tom o něco hůře, avšak jsou také stabilní ( $-32,633 \pm 2,479$  mV).





**Obrázek 23** Objemová distribuce nanočástic železa; filtrované roztoky

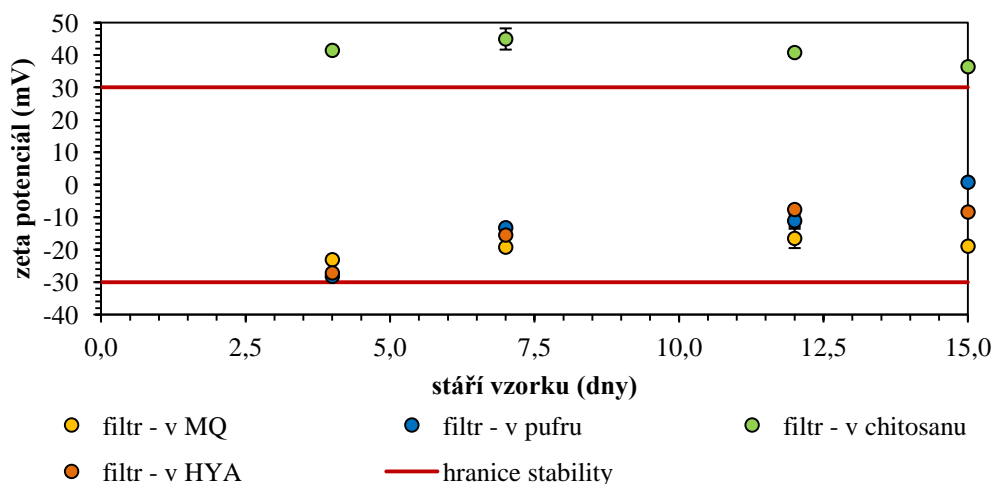


**Obrázek 24** Závislost hodnot zeta potenciálu na stabilizačním materiálu; filtrované roztoky

Připravené magnetické nanočástice byly dále charakterizovány pomocí UV-VIS spektrometrie. Prezentovaná spektra odpovídají UV-VIS spektru publikovanému v literatuře pro magnetické nanočástice (Obrázek 9). Výsledky tohoto měření tedy potvrdily, že se podařilo připravit magnetické částice (Příloha 1).

#### 4.2.2 Studium časové stálosti připravených nanočástic

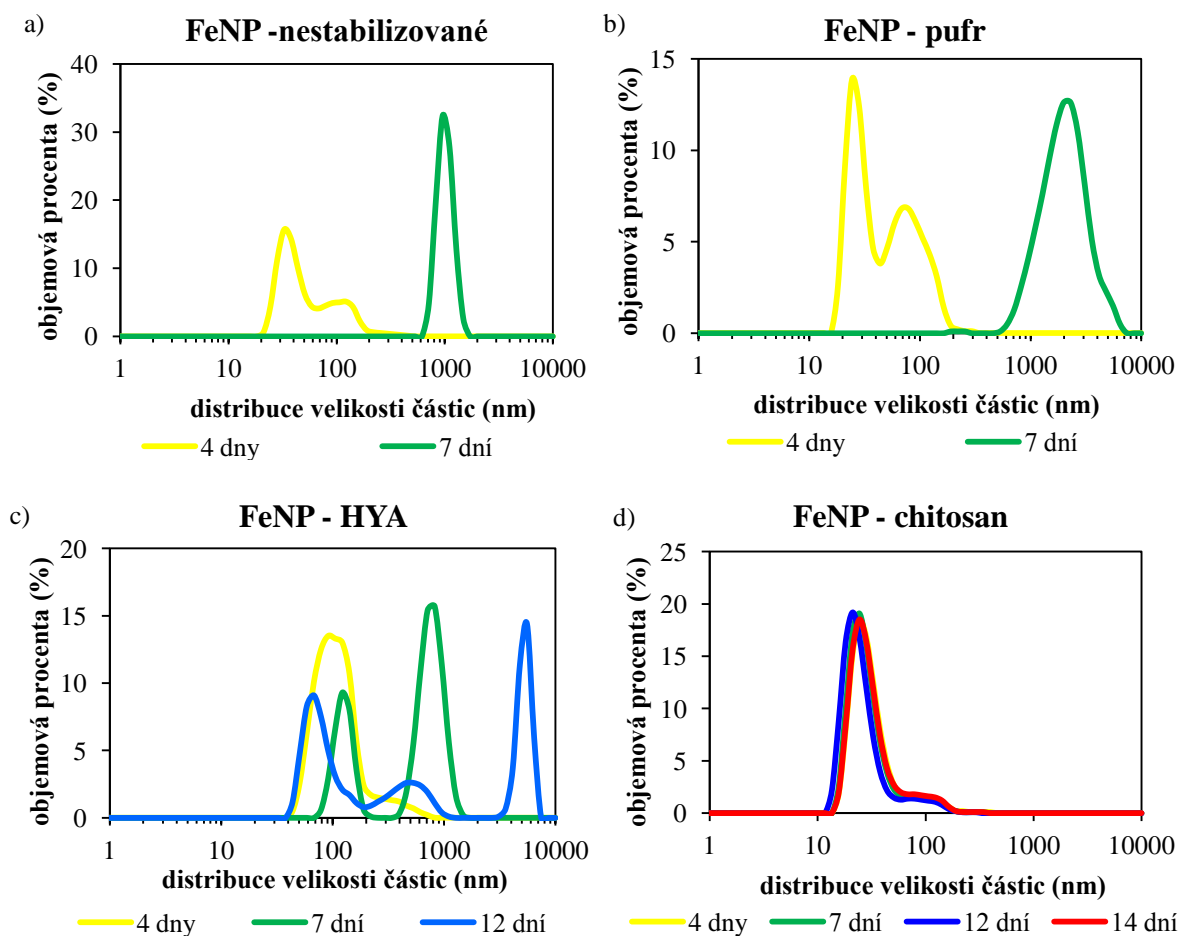
Pomocí metody elektroforetického rozptylu světla byly naměřeny hodnoty zeta potenciálu všech připravených roztoků magnetických nanočástic a následně byly pomocí programu Microsoft Excel sestaveny grafy závislosti zeta potenciálu na čase (Obrázek 25).



**Obrázek 25** Závislost hodnot zeta potenciálu na čase pro filtrované roztoky magnetických nanočástic

Z uvedeného grafu je zřejmé, že ve všech případech mají závislosti obdobnou tendenci. Výjimku tvoří vzorek stabilizovaný pomocí chitosanu, kde je po celou dobu měření hodnota zeta potenciálu větší než 30 mV, což svědčí o jeho elektrostatické stabilitě v čase.

Pomocí metody dynamického rozptylu světla byly sestrojeny objemové distribuce částic pro částice stabilizované v jednotlivých prostředích (Obrázek 26).



**Obrázek 26** Objemové distribuce znázorňující stabilitu částic neobalených (a) i obalených v pufru (b), k. hyaluronové (c) a chitosanu (d) v čase

Naměřené distribuce potvrdily to, co bylo naměřeno na základě zeta potenciálů. Ve vodě a ve fosfátovém pufru lze pozorovat výraznou agregaci částic, což bylo očekáváno. Připravené částice nejsou v těchto prostředích nijak stabilizované a podléhají samovolné agregaci v čase. S kyselinou hyaluronovou se také nepodařilo připravit stabilní částice, což by mohlo být způsobeno malou koncentrací nebo nízkou molekulovou hmotností použité kyseliny hyaluronové, která nedokázala stabilizovat částice a ochránit je před agregací. Stabilní částice se podařilo připravit pouze pomocí chitosanu, což je zřejmé z vysoké hodnoty zeta potenciálu vzorku, která se v čase mění jen minimálně. Tento trend dobře koreluje s naměřenými distribucemi velikosti částic tohoto vzorku, která je prakticky neměnná.

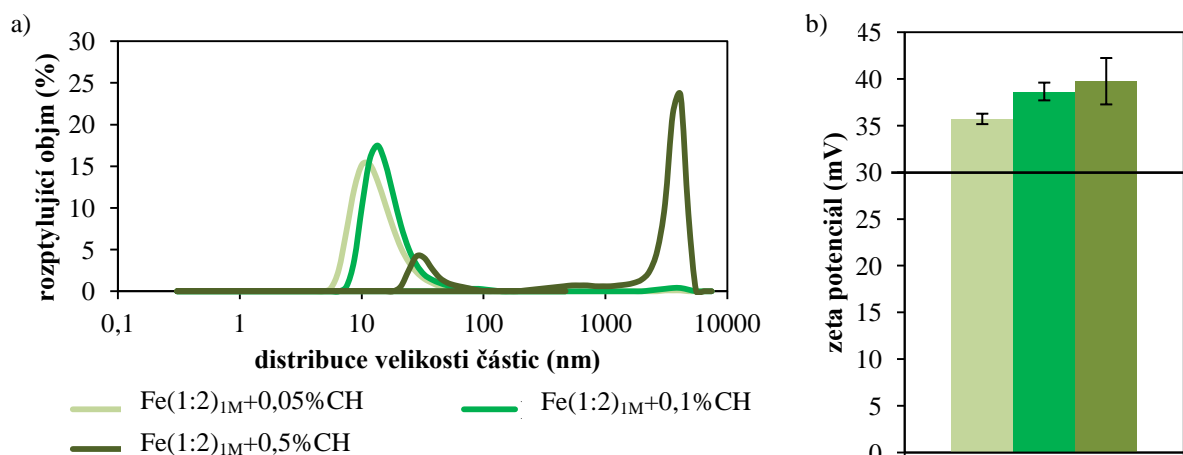
Vzhledem k výše uvedeným výsledkům byla další část práce zaměřena na optimalizaci využití chitosanu a kyseliny hyaluronové pro stabilizaci připravených FeNP.

#### 4.2.3 Studium vlivu koncentrace chitosanu

Tato kapitola se zabývá optimalizací využití chitosanu jako obalové vrstvy FeNP. Zvolené koncentrace chitosanu byly 0,05 hm.%, 0,1 hm.% a 0,5 hm.%.

Naměřená UV-VIS spektra (Příloha 2) připravených vzorků magnetických nanočástic stabilizovaných chitosanem o různých koncentracích se téměř nelišila. Ve všech případech z porovnání se spektry uvedenými v literatuře bylo potvrzeno, že studované vzorky obsahují magnetické částice.

Z objemové (Obrázek 27) distribuce je patrné, že nejlépe se podařilo připravit částice obalené 0,1% chitosanem. Měření zeta potenciálu (Obrázek 27) bylo zjištěno, že částice obalené chitosanem všech koncentrací jsou stabilní.



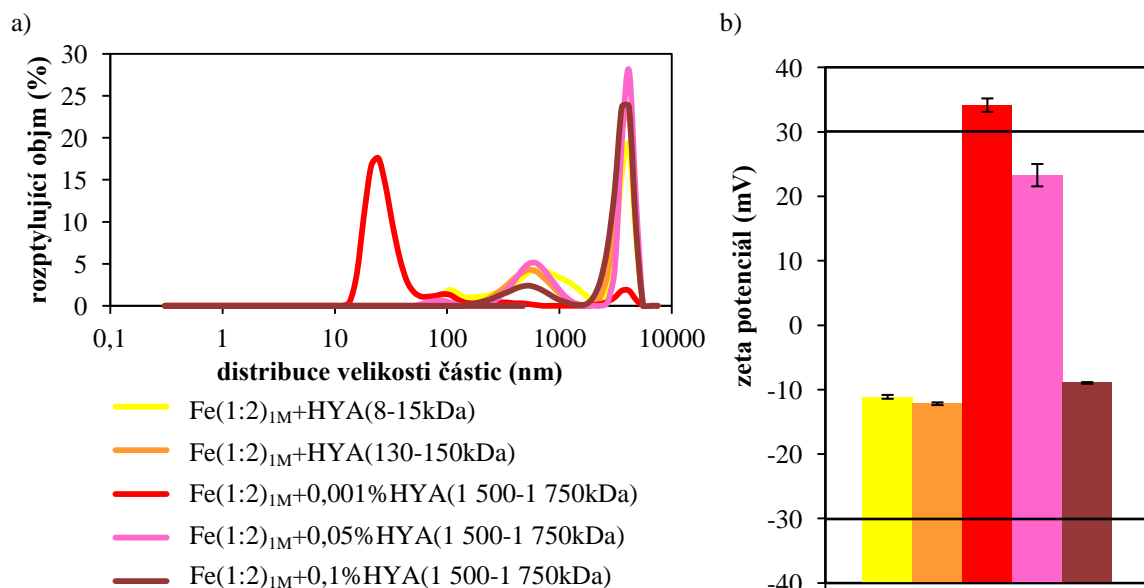
**Obrázek 27** Objemová distribuce (a) a graf znázorňující hodnoty zeta potenciálu (b) magnetických nanočástic stabilizovaných chitosanem o různých koncentracích

#### 4.2.4 Studium vlivu molekulové hmotnosti a koncentrace k. hyaluronové

Pro studium stabilizace magnetických nanočástic pomocí kyseliny hyaluronové byly zvoleny její následující molekulové hmotnosti: 8-15 kDa, 130-150kDa a 1 500-1 750 kDa (v tomto případě byly pak dále studovány různé koncentrace, a to 0,001 hm.%, 0,05 hm.% a 0,1 hm.%).

Jako v předchozích případech bylo pomocí UV-VIS spektrofotometrie (Příloha 3) dokázáno, že se podařilo připravit magnetické nanočástice.

Z objemové distribuce (Obrázek 28) lze pozorovat, že částice se podařilo obalit pouze v případě magnetických částic Fe(1:2)<sub>IM</sub>+HYA(8-15kDA), Fe(1:2)<sub>IM</sub>+HYA(130-150kDA) a Fe(1:2)<sub>IM</sub>+0,1%HYA(1 500-1 750kDA), kdy se projevila délka řetězce kyseliny hyaluronové a velikost částic značně zvětšila.



**Obrázek 28** Objemová distribuce (a) a graf znázorňující hodnoty zeta potenciálu (b) magnetických nanočástic stabilizovaných kyselinou hyaluronovou o různých molekulárních hmotnostech a různé koncentraci

Z grafu znázorňujícího závislost zeta potenciálu na molekulové hmotnosti a koncentraci kyseliny hyaluronové (Obrázek 28), lze pozorovat, že částice kyselinou hyaluronovou o molekulové hmotnosti 1 500-1 750 kDa a o koncentraci 0,001 hm.% a 0,05 hm.% nejsou vůbec obalené, neboť kyselina hyaluronová by měla částicím železa dodat záporný náboj. Zatímco částice Fe(1:2)<sub>IM</sub>+HYA(8-15kDa) a Fe(1:2)<sub>IM</sub>+HYA(130-150kDa) se již zdají být obalené, avšak nestabilní ( $-11,1 \pm 0,3$  mV a  $-12,2 \pm 0,2$  mV). Pro další analýzy pak byla tedy vybrána kyselina hyaluronová o střední molekulové hmotnosti.

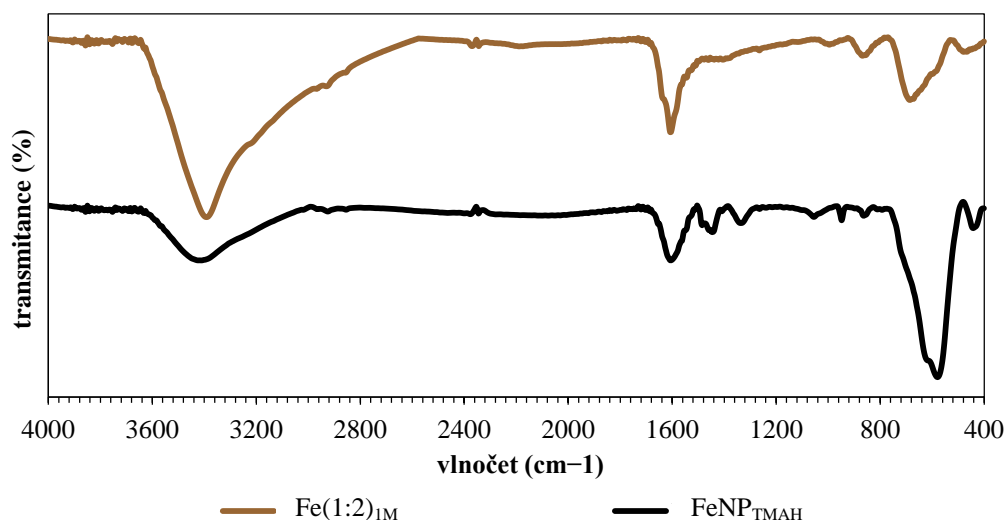
### 4.3 Charakterizace vybraných vzorků FeNP

#### 4.3.1 FT-IR analýza

FT-IR analýzou byly proměřeny nestabilizované částice – Fe(1:2)<sub>IM</sub>, FeNP<sub>TMAH</sub>; polymery – chitosan, kyselina hyaluronová (90-130kDa); stabilizované částice – Fe(1:2)<sub>IM</sub>+0,1% CH, Fe(1:2)<sub>IM</sub>+HYA(90-130 kDa).

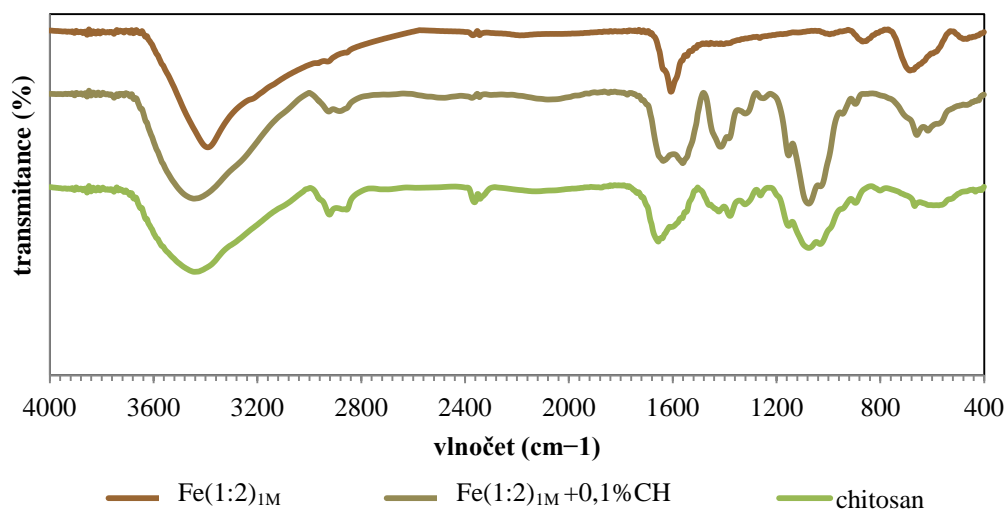
Naměřená spektra byla porovnána s FT-IR spektry z literatury (Obrázek 11) ve všech případech byla pozorována jistá podobnost.

Připravené částice Fe(1:2)<sub>IM</sub> i FeNP<sub>TMAH</sub> (Obrázek 29) vykazují charakteristické píky v nízkofrekvenčních oblastech pod  $800\text{ cm}^{-1}$ . V oblastech okolo  $3\,600\text{ cm}^{-1}$  se vyskytují píky znázorňující výskyt volných OH-skupin, které jsou přítomny díky NaOH, jímž byly FeNP v obou případech vysráženy. V případě FeNP<sub>TMAH</sub> se v oblasti okolo  $1\,400\text{ cm}^{-1}$  vyskytují píky charakteristické pro aminoskupiny [27].



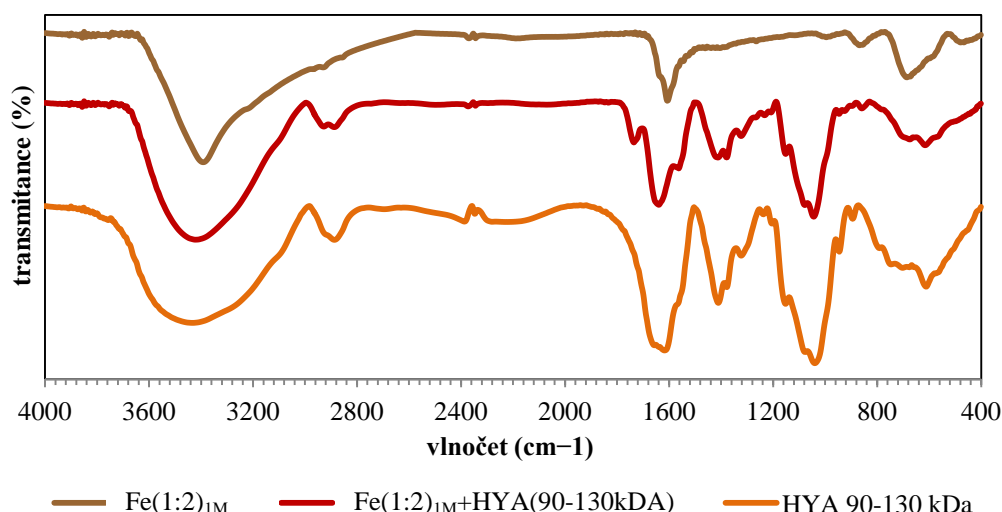
**Obrázek 29 Srovnání nestabilizovaných nanočástic ( $\text{Fe}(1:2)_{\text{IM}}$ ) se stabilizovanými částicemi pomocí TMAH**

Z FT-IR spektra chitosanu a jím obalených FeNP (Obrázek 30) je patrné, že stabilizace proběhla úspěšně. V oblasti okolo  $1\,100\text{ cm}^{-1}$  vykazují částice  $\text{Fe}(1:2)_{\text{IM}}+0,1\%\text{CH}$ , stejně jako samotný chitosan, pík, který je charakteristický pro vazby C-O, jimiž jsou jednotlivé stavební jednotky chitosanu spojené. V oblasti okolo  $1\,600\text{ cm}^{-1}$  se projevují valenční vibrace aminoskupin a aminových solí [27].



**Obrázek 30 Srovnání infračervených spekter nestabilizovaných nanočástic, nanočástic stabilizovaných chitosanem a samotného chitosanu**

FT-IR spektrum (Obrázek 31) kyseliny hyaluronové a částic  $\text{Fe}(1:2)_{\text{IM}}+\text{HYA}(90\text{-}130\text{ kDa})$  opět dokazují, že jsou nanočástice opravdu obalené. V oblasti kolem  $1\,600\text{ cm}^{-1}$  se vyskytuje charakteristické píky pro karboxylové skupiny, amidové vazby a symetrické valenční vibrace derivátů karboxylových skupin [27].



**Obrázek 31 Srovnání infračervených spekter nestabilizovaných nanočástic, nanočástic stabilizovaných kyselinou hyaluronovou a samotné kyseliny hyaluronové**

#### 4.3.2 Rentgenová prášková difraktometrie (XRD)

Pomocí rentgenové difraktometrie bylo určeno přibližné složení fází krystalografické struktury připravených vzorků magnetických nanočástic.

Ve všech proměřovaných vzorcích byla pozorována přítomnost NaCl (halit), který vznikl nejpravděpodobněji reakcí chloridových a sodných iontů přítomných díky výchozím surovinám syntézy nanočástic.

Ve vzorcích  $\text{Fe}(1:2)_{\text{IM}}$  byla vypořizována přítomnost původního  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , z kterých byly částice připravovány a struktura  $\beta\text{-FeO}(\text{OH})$  (akageneit), přítomnost  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (magnetitu) nebyla pozorována. Částice  $\text{Fe}(1:2)_{\text{SM}}$  ve své struktuře obsahovaly už i magnetit. V případě částic  $\text{FeNP}_{\text{TMAH}}$  již nebyl přítomen akageneit, ale pouze magnetit.

Stabilizovaných částic bylo pro analýzu velmi malé množství, tudíž nebyla spektra dostatečně jasná. Ve všech případech byla však prokázána přítomnost magnetitu.

Výše uvedené výsledky jsou znázorněny v tabulce 9, kde znaménko + označuje přítomnost dané krystalové struktury a znaménko – její nepřítomnost.

**Tabulka 9 Složení fází krystalografické struktury magnetických nanočástic**

vzorek	typ krystalu			
	$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Halit	Akageneit	Magnetit
$\text{Fe}(1:2)_{\text{IM}}$	+	+	+	–
$\text{Fe}(1:2)_{\text{SM}}$	–	+	+	+
$\text{FeNP}_{\text{TMAH}}$	–	+	–	+
$\text{Fe}(1:2)_{\text{SM}} + 0,1\% \text{ Chitosan}$	–	+	+	+
$\text{FeNP}_{\text{TMAH}} + 0,1\% \text{ Chitosan}$	–	+	+	+
$\text{FeNP}_{\text{TMAH}} + \text{HYA (90-130 kDa)}$	–	+	+	+

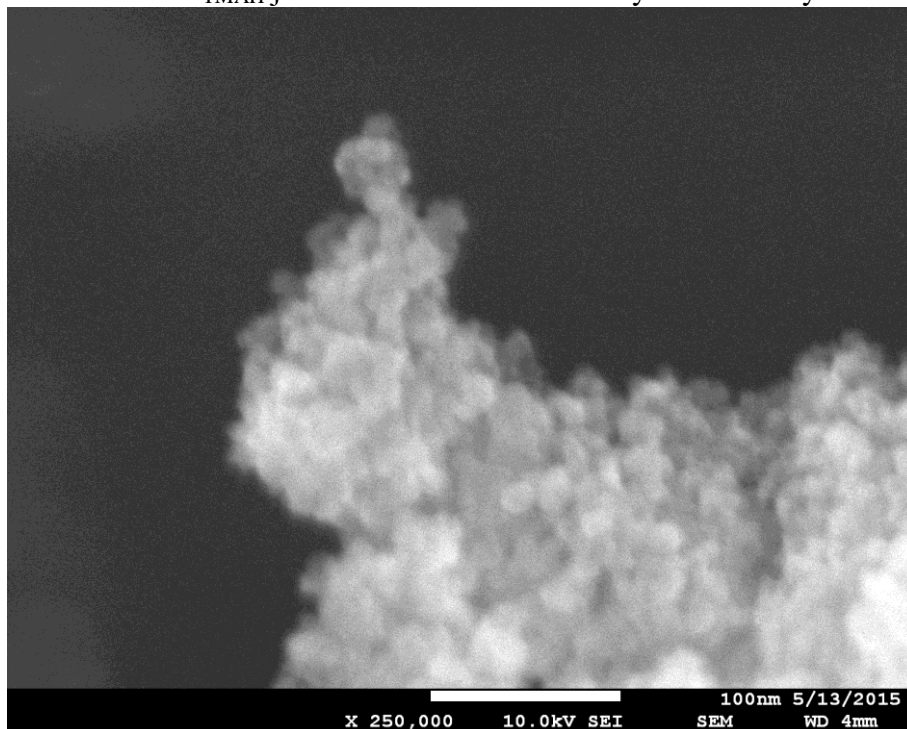
XRD analýza potvrdila, že v případě částic  $\text{Fe}(1:2)_{\text{SM}}$  a  $\text{FeNP}_{\text{TMAH}}$  a jejich obalených variant se podařilo připravit strukturu  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (magnetitu).

#### 4.3.3 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

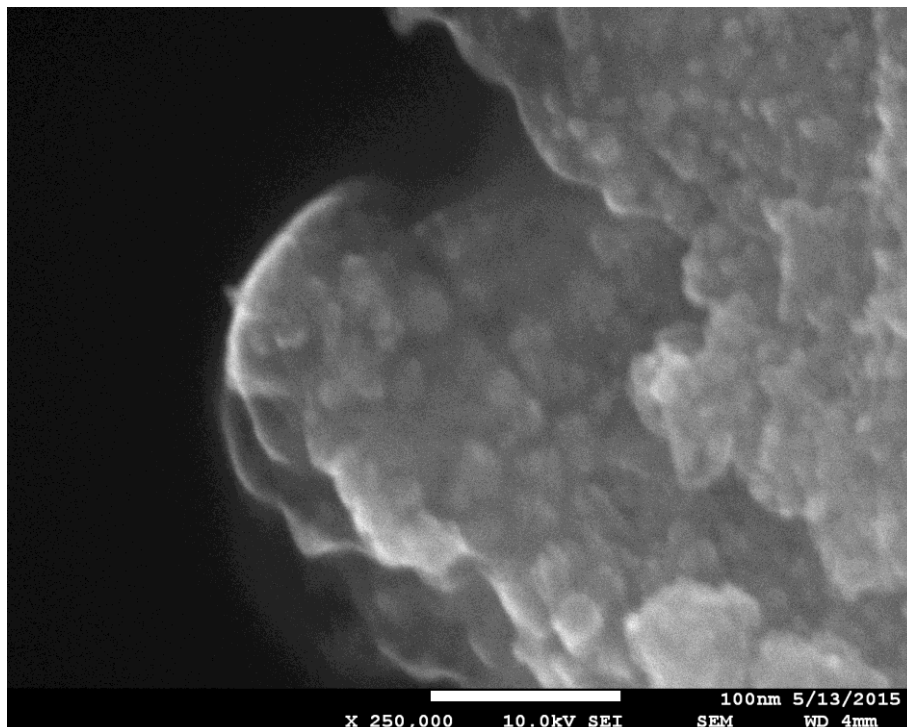
Skenovací elektronovou mikroskopií byly pořízeny snímky nestabilizovaných magnetických částic  $\text{Fe}(1:2)_{\text{IM}}$ ,  $\text{Fe}(1:2)_{\text{SM}}$  a  $\text{FeNP}_{\text{TMAH}}$ .

Na snímku zobrazujícím částice  $\text{Fe}(1:2)_{\text{IM}}$  (Příloha 4) jsou vidět spíše celistvé plochy, což pravděpodobně souvisí s tím, že magnetitu ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) vzniklo ve vzorku velmi málo (viz XRD analýza, kapitola 4.3.2).

Zatímco na snímcích, které zobrazují částice  $\text{FeNP}_{\text{TMAH}}$  (Obrázek 32) a  $\text{Fe}(1:2)_{5\text{M}}$  (Obrázek 33), můžeme pozorovat malé částice, jejichž velikost odpovídá asi 20-30 nm, což potvrzuje přítomnost magnetitu. Částice  $\text{Fe}(1:2)_{5\text{M}}$  však tvoří i větší agregáty, protože nejsou vůbec stabilizované. Částice  $\text{FeNP}_{\text{TMAH}}$  jsou stabilizované tetramethylamonium hydroxidem.



Obrázek 32 Snímek částic  $\text{FeNP}_{\text{TMAH}}$



Obrázek 33 Snímek částic  $\text{Fe}(1:2)_{5\text{M}}$

## 5 Závěr

V teoretické části této práce byly shrnuty obecné informace o magnetických nanočásticích – jejich stavbě, vlastnostech, využití, přípravě a stabilizaci.

V experimentální části je popsána příprava a stabilizace magnetických nanočástic, která byla zvolena v rámci mé bakalářské práce. K jejich přípravě byla použita koprecipitační metoda a k jejich stabilizaci byly využity tetramethylamonium, Milli-Q voda, pufr, polyvinylalkohol, kyselina hyaluronová a chitosan.

Dále jsou v experimentální části uvedeny výsledky základní charakterizace magnetických nanočástic pomocí UV-VIS spektrometrie a metod dynamického a elektroforetického rozptylu světla. V rámci diskuze výsledků jsou rovněž uvedeny výsledky časové stálosti připravených magnetických nanočástic studovaných pomocí metod rozptylu světla. Z výsledků vyplývá, že stabilní částice se nám podařilo připravit pouze v případě stabilizace pomocí chitosanu. Následně pak byl studován vliv koncentrace chitosanu a molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové na stabilitu nanočástic.

Pomocí FT-IR analýzy, rentgenové difrakční analýzy a skenovací elektronové mikroskopie byly provedeny další charakteristiky vybraných částic.

Využitím FT-IR analýzy bylo ověřeno, že magnetické nanočástice se podařilo obalit chitosanem a kyselinou hyaluronovou.

XRD analýza potvrdila, že v případě částic  $\text{Fe}(1:2)_{5\text{M}}$  a  $\text{FeNP}_{\text{TMAH}}$  se podařilo připravit strukturu  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (magnetitu).

Skenovací elektronová mikroskopie ukázala, že nejlépe se podařilo připravit magnetické částice  $\text{FeNP}_{\text{TMAH}}$ , jež měly velikost asi 20-30 nm a byly stabilní.



## 6 Literatura

1. HOŠEK, Jan. *Úvod do nanotechnologie*. Vyd. 1. V Praze: České vysoké učení technické, 2010, 170 s. ISBN 978-80-01-04555-8.
2. RAMSDEN, Jeremy. *Nanotechnology: an introduction*. Waltham, MA.: William Andrew/Elsevier, 2011, xiii, 272 p. ISBN 00-809-6447-8
3. HOSOKAWA, Masuo. *Nanoparticle technology handbook*. 1st ed. Boston [Mass.]: Elsevier, 2007, xxi, 622 p. ISBN 04-445-3122-X.
4. WEBSTER, Thomas J. *Nanomedicine: technologies and applications*. 80 High Street, Sawston, Cambridge CB22 3HJ, U: Woodhead Publishing Limited, 2012, xxii, 680 p. Woodhead Publishing series in biomaterials, no. 49. ISBN 978-0-85709-233-5.
5. MCBAIN, Stuart C., Humphrey H. P. YIU a Jon DOBSON. Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. *International journal of Nanomedicine*. 2008, vol. 3, issue 2, s.169-180.
6. LAURENT, Sophie, Delphine FORGE, Marc PORT, Alain ROCH, Caroline ROBIC, Luce VANDER ELST a Robert N. MULLER. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chemical Reviews*. 2008, vol. 108, issue 6, s. 2064-2110. DOI: 10.1021/cr068445e. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr068445e>
7. TARTAJ, Pedro, Mar a del Puerto MORALES, Sabino VEINTEMILLAS-VERDAGUER, Teresita GONZ LEZ.CARRE O a Carlos J SERNA. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2003-07-07, vol. 36, issue 13, R182-R197. DOI: 10.1088/0022-3727/36/13/202. Dostupné z: <http://stacks.iop.org/0022-3727/36/i=13/a=202?key=crossref.a2adf492ddbb094e3fa1b0ef0c95a015>
8. Indira TK, Lakshmi PK (2010) Magnetic nanoparticles—a review. *Int J Pharm Sci Nanotec* 3:1035–1044
9. ODENBACH, Stefan. *Ferrofluids: magnetically controllable fluids and their applications*. New York: Springer, c2002, xi, 251 p. ISBN 35-404-3978-1.
10. MASSART, René. Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media. *IEEE TRANSACTIONS ON MAGNETICS*. 1981, roč. 17, č. 2, s. 1247-1248.
11. GUPTA, Ajay Kumar a Mona GUPTA. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*. 2005, vol. 26, issue 18, s. 3995-4021. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.10.012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961204009317>
12. PASCAL, C., J. L. PASCAL, F. FAVIER, M. L. ELIDRISSI MOUBTASSIM a C. PAYEN. Electrochemical Synthesis for the Control of  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanoparticle Size. Morphology, Microstructure, and Magnetic Behavior. *Chemistry of Materials*. 1999, vol. 11, issue 1, s. 141-147. DOI: 10.1021/cm980742f. Dostupné z:<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cm980742f>
13. SUSLICK, K. S. Sonochemistry. *Science*. 1990-03-23, vol. 247, issue 4949, s. 1439-1445. DOI: 10.1126/science.247.4949.1439. Dostupné z:<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.247.4949.1439>
14. MATSUNAGA, Tadashi, Yoshiko OKAMURA a Tsuyoshi TANAKA. Biotechnological application of nano.scale engineered bacterial magnetic particles. *Journal of Materials Chemistry*. 2004, vol. 14, issue 14, s. 2099-. DOI: 10.1039/b404844j. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b404844j>
15. DAVIS, S.S. Biomédical applications of nanotechnology — implications for drug targeting and gene therapy. *Trends in Biotechnology*. 1997, vol. 15, issue 6, s. 217-224. DOI: 10.1016/S0167-7799(97)01036-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779997010366>

16. CSID:3338349, <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.3338349.html> (accessed 16:49, Mar 26, 2015)
17. LI, Gui-yin, Yu-ren JIANG, Ke-long HUANG, Ping DING a Jie CHEN. Preparation and properties of magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>–chitosan nanoparticles. *Journal of Alloys and Compounds*. 2008, vol. 466, 1-2, s. 451-456. DOI: 10.1016/j.jallcom.2007.11.100. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925838807022001>
18. KAUSHIK, Ajeet, Raju KHAN, Pratima R. SOLANKI, Pratibha PANDEY, Javed ALAM, Sharif AHMAD a B.D. MALHOTRA. Iron oxide nanoparticles–chitosan composite based glucose biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*. 2008, vol. 24, issue 4, s. 676-683. DOI: 10.1016/j.bios.2008.06.032. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566308002790>
19. CSID:2342878, <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.2342878.html> (accessed 17:05, Mar 26, 2015)
20. I, Jingchao, Yao HE, Wenjie SUN, Yu LUO, Hongdong CAI, Yunqi PAN, Mingwu SHEN, Jindong XIA a Xiangyang SHI. Hyaluronic acid-modified hydrothermally synthesized iron oxide nanoparticles for targeted tumor MR imaging. *Biomaterials*. 2014, vol. 35, issue 11, s. 3666-3677. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.01.011. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961214000131>
21. CSID:2341173, <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.2341173.html> (accessed 16:46, Mar 26, 2015)
22. GUPTA, A.K. a S. WELLS. Surface-Modified Superparamagnetic Nanoparticles for Drug Delivery: Preparation, Characterization, and Cytotoxicity Studies. *IEEE Transactions on Nanobioscience*. 2004, vol. 3, issue 1, s. 66-73. DOI: 10.1109/TNB.2003.820277. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/lpdocs/epic03/wrapper.htm?arnumber=1273511>
23. VO-DINH, Tuan a G GAUGLITZ. *Handbook of spectroscopy*. Cambridge: Wiley-VCH, c2003, 2 v. 538 p. ISBN 35-272-9782-0.
24. CHEREMISINOFF, Nicholas P. *Polymer characterization: laboratory techniques and analysis*. Westwood, N.J.: Noyes Publications, c1996, xi, 251 p. ISBN 08-155-1403-4.
25. KLAČANOVÁ, K., P. FODRAN, P. ŠIMON, P. RAPTA, R. BOČA, V. JORÍK, M. MIGLIERINI, E. KOLEK a L'. ČAPLOVIČ. Formation of Fe(0)-Nanoparticles via Reduction of Fe(II) Compounds by Amino Acids and Their Subsequent Oxidation to Iron Oxides. *Journal of Chemistry*. 2013, vol. 2013, s. 1-10. DOI: 10.1155/2013/961629. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/jchem/2013/961629/>
26. STUART, Barbara. *Infrared spectroscopy: fundamentals and applications*. Hoboken, NJ: J. Wiley, c2004, xv, 224 p. ISBN 04-708-5428-6.
27. OTYEPKOVÁ, Eva. *Základy vybraných experimentálních chemických metod*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2013, 97 s. ISBN 978-80-244-3754-5.
28. BHATTARAI, Shanta R, Remant B KC, Sun Y KIM, Manju SHARMA, Myung S KHIL, Pyoung H HWANG, Gyung H CHUNG a Hak Y KIM. N-hexanoyl chitosan stabilized magnetic nanoparticles: Implication for cellular labeling and magnetic resonance imaging. *Journal of Nanobiotechnology*. 2008, vol. 6, issue 1, s. 1-. DOI: 10.1186/1477-3155-6-1. Dostupné z: <http://www.jnanobiotechnology.com/content/6/1/1>
29. DENG, Yu, Dengru LIU, Guocheng DU, Xiufen LI a Jian CHEN. Preparation and characterization of hyaluronan/chitosan scaffold cross-linked by 1—ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide. *Polymer International*. 2007, vol. 56, issue 6, s. 738-745. DOI: 10.1002/pi.2197. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pi.2197>
30. NEBESÁŘOVÁ, Jana. Elektronová mikroskopie pro biology [online]. 2001 [cit. 2015-01-04]. Dostupné z: <http://www.paru.cas.cz/>
31. MÁŠILKO, J. Rentgenová difrakční analýza na práškových vzorcích. Chempoint.cz [online]

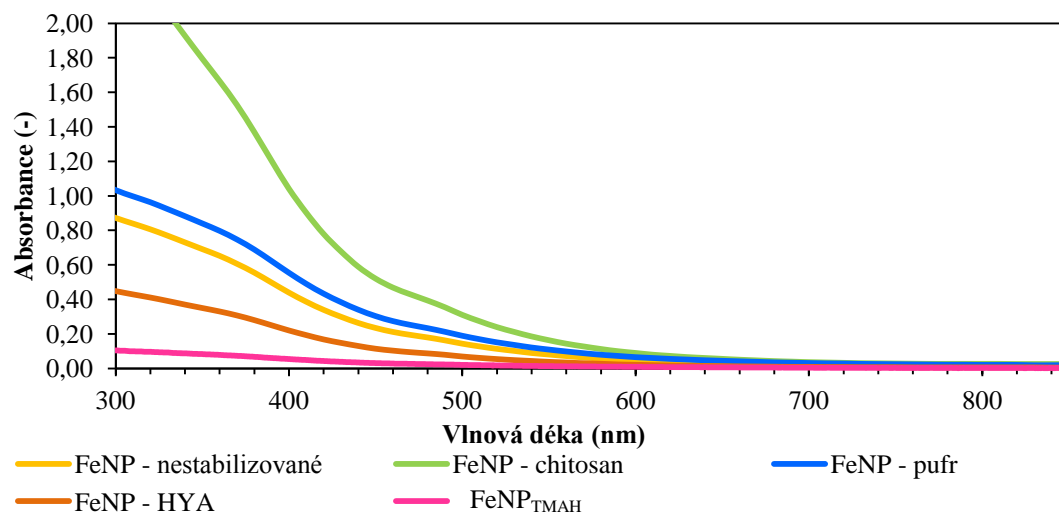
32. LU, An-Hui, Dongyuan ZHAO a Ying WAN. *Nanocasting: a versatile strategy for creating nanostructured porous materials*. Cambridge: RSC Pub., c2010, xii, 265 p. ISBN 08-540-4188-5.
33. Zetasizer Nano Příručka pro uživatele, MANO317, vydání 3.0, leden 2007. 195 s. (Malvern Instruments Ltd. Enigma Business Park, Grovewood Road, Malvern, Worcestershire WR14 1XZ, Velká Británie).
34. EDWARD, John T. Molecular volumes and the Stokes-Einstein equation. *Journal of Chemical Education*. 1970, vol. 47, issue 4, s. 261-. DOI: 10.1021/ed047p261. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed047p261>
35. ARRUEBO, Manuel, Rodrigo FERNÁNDEZ-PACHECO, M. Ricardo IBARRA a Jesús SANTAMARÍA. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nano Today*. 2007, vol. 2, issue 3, s. 22-32. DOI: 10.1016/S1748-0132(07)70084-1. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1748013207700841>
36. CHOMOUCKA, Jana, Jana DRBOHLAVOVA, Dalibor HUSKA, Vojtech ADAM, Rene KIZEK a Jaromir HUBALEK. Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering. *Pharmacological Research*. 2010, vol. 62, issue 2, s. 144-149. DOI: 10.1016/j.phrs.2010.01.014. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043661810000289>
37. SUN, C, J LEE a M ZHANG. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008-08-17, vol. 60, issue 11, s. 1252-1265. DOI: 10.1016/j.addr.2008.03.018. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X08001014>
38. GULDU, Ozge Kozgus, Perihan UNAK, E. Ilker MEDINE, F. Baris BARLAS, F. ZUMRUT Biber MUFTULER a Suna TIMUR. Radioiodinated Magnetic Nanoparticles Conjugated With Moxifloxacin: Synthesis and In Vitro Biological Affinities. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 2014-11-03, vol. 64, issue 5, s. 253-259. DOI: 10.1080/00914037.2014.936597. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00914037.2014.936597>
39. GÓMEZ-SOTOMAYOR, Ricardo, S. AHUALLI, Julián L. VIOTA, Katarzyna RUDZKA a Ángel V. DELGADO. Iron/Magnetite Nanoparticles as Magnetic Delivery Systems for Antitumor Drugs. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2015-05-01, vol. 15, issue 5, s. 3507-3514. DOI: 10.1166/jnn.2015.9856. Dostupné z: <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article>
40. MALTAS, Esra a Betül ERTEKIN. Binding of actin to thioglycolic acid modified superparamagnetic nanoparticles for antibody conjugation. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2015, vol. 72, s. 984-989. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.10.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813014006825>
41. HUANG, Jing, Qing SHU, Liya WANG, Hui WU, Andrew Y. WANG a Hui MAO. Layer-by-layer assembled milk protein coated magnetic nanoparticle enabled oral drug delivery with high stability in stomach and enzyme-responsive release in small intestine. *Biomaterials*. 2015, vol. 39, s. 105-113. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.10.059. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961214011235>
42. LAMMERS, Twan, Patrick KOCZERA, Stanley FOKONG, Felix GREMSE, Josef EHLING, Michael VOGT, Andrij PICH, Gert STORM, Marc VAN ZANDVOORT a Fabian KIESSLING. Theranostic USPIO-Loaded Microbubbles for Mediating and Monitoring Blood-Brain Barrier Permeation. *Advanced Functional Materials*. 2015, vol. 25, issue 1, s. 36-43. DOI: 10.1002/adfm.201401199. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/adfm.201401199>

43. KIM, Ji-Eun, Ji-Young SHIN a Myung-Haing CHO. Magnetic nanoparticles: an update of application for drug delivery and possible toxic effects. *Archives of Toxicology*. 2012, vol. 86, issue 5, s. 685-700. DOI: 10.1007/s00204-011-0773.3. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00204-011-0773-3>
44. KIM, J. S. Toxicity and Tissue Distribution of Magnetic Nanoparticles in Mice. *Toxicological Sciences*. 2005-10-26, vol. 89, issue 1, s. 338-347. DOI: 10.1093/toxsci/kfj027.  
Dostupné z: <http://www.toxsci.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/toxsci/kfj027>
45. KWON, Jung-Taek, Soon-Kyung HWANG, Hua JIN, Dae-Seong KIM, Arash MINAI-TEHRANI, Hee-Jeong YOON, Mansoo CHOI, Tae-Jong YOON, Duk-Young HAN, Young-Woon KANG, Byung-Il YOON, Jin-Kyu LEE a Myung-Haing CHO. Body Distribution of Inhaled Fluorescent Magnetic Nanoparticles in the Mice. *Journal of Occupational Health*. 2008, vol. 50, issue 1, s. 1-6. DOI: 10.1539/joh.50.1. Dostupné z: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/joh/50.1?from=CrossRef>
46. BUŠINOVÁ, Petra, Jana CHOMOUCÁ, Jan PRÁŠEK, Radim HRDÝ, Jana DRBOHLAVOVÁ, Petr SEDLÁČEK a Jaromír HUBÁLEK. Polymer-coated iron oxide magnetic nanoparticles – preparation and chracterization. In: 3RD INTERNATIONAL CONFERENCE OF NANOTECHNOLOGY, September 21st - 23rd 2011. *NANOCON 2011: conference proceedings*. Ostrava: Tanger, 2011, s. 1-6. ISBN 9788087294277.

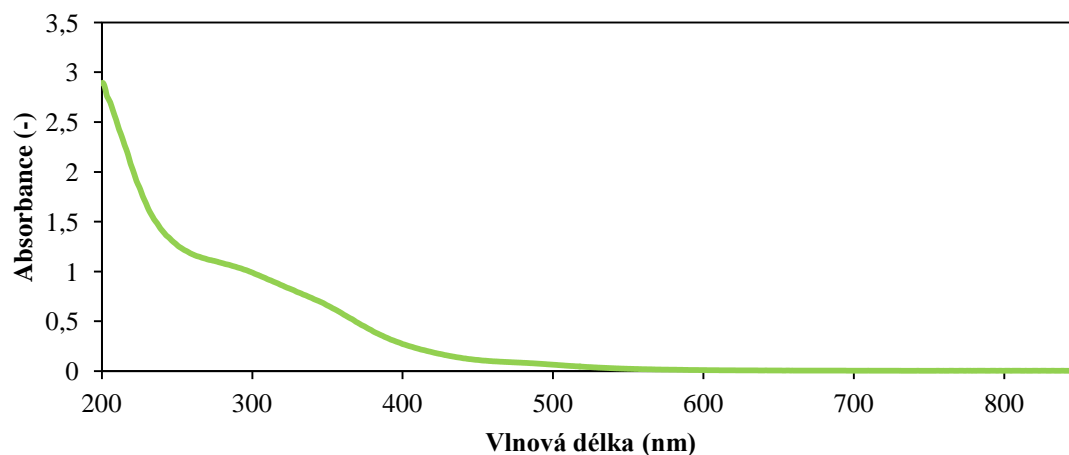
## 7 Seznam použitých zkratk a symbolů

V/O	emulze voda v oleji
DMF	N,N-dimethylformamid
SPIO	superparamagnetické nanočástic oxidů železa
HYA	kyselina hyaluronová
PEG	polyethylenglykol
PVA	polyvinylalkohol
UV-VIS	ultrafialovo-viditelná spektroskopie
$I_0$	intenzita dopadajícího záření
$I$	intenzita prošlého záření
$A$	absorbance (absorbované záření)
$\varepsilon$	molární absorpční koeficient
$c$	molární koncentrace
$l$	optická dráha kyvety
Fe	železo
FT-IR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
XRD	rentgenová difrakční analýza
$\lambda$	vlnová délka
$n$	hlavní kvantové číslo
$d$	vzdálenost mezi krystalovými rovinami
$\theta$	Braggův úhel
DLS	dynamický rozptyl světla
$D^0$	difuzní koeficient
$k$	Boltzmannova konstanta
$\eta$	viskozita kapaliny
$r$	hydrodynamický poloměr kulovité částice
$T$	termodynamická teplota
ELS	elektroforetický rozptyl světla
HRP	peroxidáza křenu selského
SDS	sodiumdisulfát
IO	oxidy železa
LBL	vrstva po vrstvě
CN	kasein
DOX	doxorubicin
ICG	indocyaninová zeleň
MB	mikrobubliny
USPIO	ultramalé superparamagnetické nanočástice oxidů železa
FeNP	magnetické nanočástice
TMAH	tetramethylamonium hydroxid

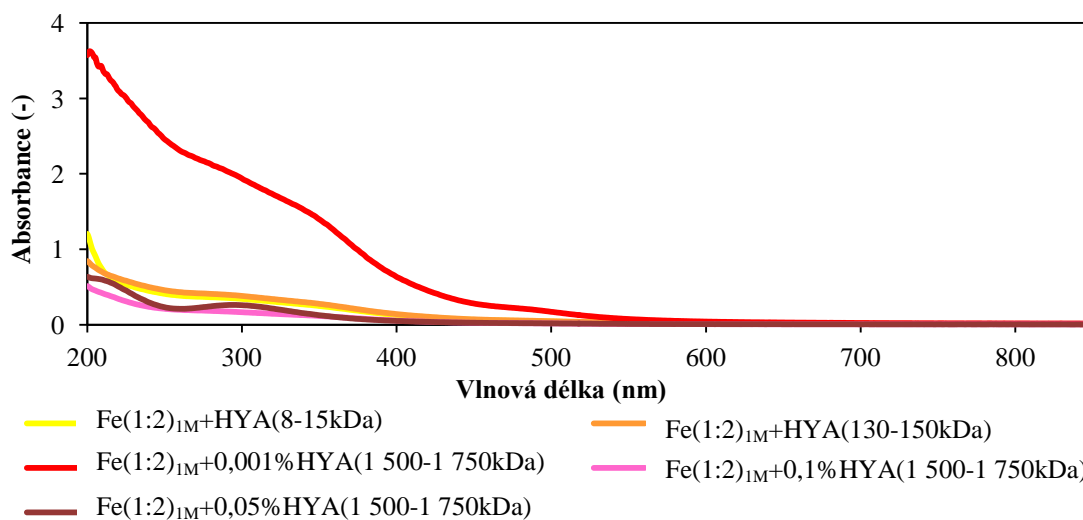
## 8 Přílohy



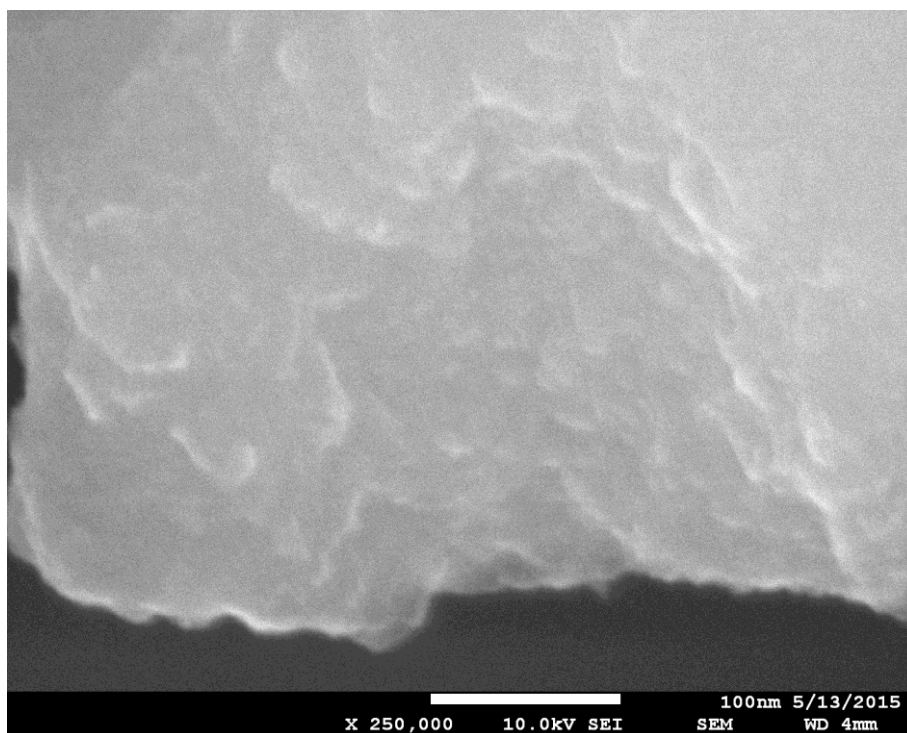
**Příloha 1 Absorpční spektrum magnetických nanočástic srovnávající různé formy obalových vrstev**



**Příloha 2 Absorpční spektrum magnetických nanočástic stabilizovaných 0,1 hm.% chitosanem**



**Příloha 3 Absorpční spektra magnetických nanočástic obalených kyselinou hyaluronovou o různých molekulových hmotnostech a různé koncentrace**



**Příloha 4 Snímek částic  $\text{Fe(1:2)}_{\text{IM}}$**